

Titre: Mise en évidence de biomarqueurs des cellules souches de la gelée de Wharton par modélisation dynamique des flux métaboliques : l'impact du vieillissement cellulaire
Title:

Auteur: Benoît Laflaquiere
Author:

Date: 2017

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Laflaquiere, B. (2017). Mise en évidence de biomarqueurs des cellules souches de la gelée de Wharton par modélisation dynamique des flux métaboliques : l'impact du vieillissement cellulaire [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/2694/>
Citation:

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/2694/>
PolyPublie URL:

Directeurs de recherche: Mario Jolicoeur
Advisors:

Programme: Génie biomédical
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

MISE EN ÉVIDENCE DE BIOMARQUEURS DES CELLULES SOUCHES DE LA GELÉE
DE WHARTON PAR MODÉLISATION DYNAMIQUE DES FLUX MÉTABOLIQUES :
L'IMPACT DU VIEILLISSEMENT CELLULAIRE

BENOÎT LAFLAQUIERE

INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE BIOMÉDICAL)

AOÛT 2017

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé:

MISE EN ÉVIDENCE DE BIOMARQUEURS DES CELLULES SOUCHES DE LA GELÉE
DE WHARTON PAR MODÉLISATION DYNAMIQUE DES FLUX MÉTABOLIQUES :
L'IMPACT DU VIEILLISSEMENT CELLULAIRE

présenté par : LAFLAQUIERE Benoît

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. DE CRESCENZO Gregory, Ph. D., président

M. JOLICOEUR Mario, Ph. D., membre et directeur de recherche

M. HENRY Olivier, Ph. D., membre

DÉDICACE

À ma famille et aux potis...

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord débiter en remerciant le Pr. Mario Jolicoeur qui m'a proposé mon sujet de recherche pour ce mémoire et qui m'a encadré et guidé tout au long de ce parcours. Merci également de m'avoir fait confiance pour mener à bien ce projet et d'avoir su me guider tout en me donnant la latitude nécessaire pour réussir.

Je tiens également à remercier Jingkui Chen qui m'a énormément aidé pour la partie expérimentale de ce mémoire, notamment pour les analyses chimiques. Je veux aussi remercier Gabrielle Leclercq qui m'a été d'une grande aide durant son stage de fin d'études pour les cultures cellulaires en plaques et les manipulations en laboratoire. Un merci spécial aussi à tous mes collègues du laboratoire pour leur appui, leurs supports et leurs conseils.

J'aimerais également à remercier Caryn Ito qui a fourni les lignées cellulaires et a réalisé les expériences de caractérisation des propriétés immunosuppressives des cellules. De même que Sabine Peres qui a réalisé un programme de génération automatique d'équations différentielles facilitant la réalisation des différentes simulations.

Finalement, j'aimerais remercier ma famille et mes amis qui m'ont supporté tout au long de ce projet qui se termine.

RÉSUMÉ

Le système immunitaire, garant de la santé d'un organisme, est composé d'un ensemble de cellules aux fonctions diverses qui régulent et participent à la réponse immunitaire. Il est maintenant bien connu, grâce aux diverses études sur les cellules cancéreuses, que certains mécanismes cellulaires sont programmés pour inhiber la réponse immunitaire, un phénomène appelé immunosuppression. Le contrôle de ce phénomène d'immunosuppression pourrait donc conduire à des progrès importants pour le traitement de diverses maladies et pathologies en plus du cancer, par exemple en empêchant les rejets de greffes ou en limitant l'impact des maladies auto-immunes. La thérapie cellulaire, avec l'injection de cellules ayant des propriétés immunosuppressives, semble donc une approche thérapeutique hautement prometteuse. En effet, certaines cellules souches ont montré une grande capacité à acquérir des propriétés immunosuppressives dans des conditions de culture spécifiques. Parmi elles, les cellules souches mésenchymateuses de la gelée de Wharton (WJMSC) ont également la qualité d'être récupérables d'une manière non invasive à partir du cordon ombilical. Cependant, la caractérisation des propriétés immunosuppressives des cellules ne peut être effectuée que par des manipulations coûteuses et longues, et le maintien de ces propriétés après injection reste aléatoire. Puisque le temps joue contre la construction de thérapies cellulaire robustes, il est nécessaire de mettre en place de nouveaux outils permettant de caractériser rapidement le caractère immunosuppressif des cellules et de mieux contrôler (par exemple, maintenir) le phénotype d'intérêt des cellules post-injection. Parmi les plates-formes omics récentes, l'étude du métabolisme cellulaire semble appropriée pour caractériser les propriétés immunosuppressives des cellules WJMSC et devrait mettre en évidence de nouveaux biomarqueurs de l'évolution du phénotype des WJMSC. En effet, le métabolome cellulaire est à l'interface entre le génome et le protéome, tous deux déterminant le phénotype cellulaire. Compte tenu de la complexité du métabolisme, il est nécessaire de mettre en œuvre des techniques informatiques pour l'analyse rapide des dynamiques des réactions enzymatiques intracellulaires du réseau.

Pour répondre à la nécessité d'une meilleure caractérisation du phénotype des WJMSC, l'objectif de cette étude est d'identifier les biomarqueurs du caractère immunosuppressif des cellules souches de la gelée de Wharton. Ainsi, étant donné que les WJMSC perdent leurs propriétés immunosuppressives avec le nombre de passage cellulaire, une comparaison des cellules à

nombre de passages faible et élevé a été effectuée. Cependant, le biais potentiel associé à la sénescence avancée des cellules à haut passage se devait d'être d'abord envisagé. Le présent travail met donc l'accent sur la comparaison des WJMSC à faible et à haut passage, non immunosuppressives, en développant deux modèles cinétiques permettant de simuler le métabolisme des cellules aux différents âges. La structure du réseau métabolique étudié est basée sur un travail de modélisation antérieur, effectué sur des cellules de mammifères, qui a été complété par l'ajout de voies métaboliques spécifiquement impliquées dans le phénomène d'immunosuppression. Par conséquent, l'analyse des cultures des WJMSC à passages faible (4 passages) et élevé (9 passages), a conduit à un premier modèle cinétique décrivant le comportement moyen des cellules. Par la suite, les paramètres sensibles de ce modèle ont été mis en évidence par analyse de leur impact sur l'erreur de simulation globale du modèle. Enfin, en modifiant ces paramètres sensibles uniquement, deux modèles ont été développés décrivant distinctement le métabolisme des cellules de passage faible et élevé. La comparaison des deux modèles a fourni des informations précieuses sur les flux de réaction et les comportements des concentrations de métabolites, ce qui a permis d'identifier des biomarqueurs distincts.

Nous montrons ainsi clairement que le nombre de passages cellulaires conduit à une croissance cellulaire plus lente ainsi qu'à une demande énergétique accrue des cellules. En atteignant un nombre de passage élevé, les cellules réorientent principalement leur flux glycolytique vers le cycle TCA et produisent moins de lactate, ont un taux de renouvellement d'ATP plus élevé et produisent leur ATP principalement par phosphorylation oxydante (c'est-à-dire par respiration cellulaire) au lieu de la glycolyse. Au contraire, les cellules à faible passage utilisent principalement la glycolyse pour répondre à leurs besoins énergétiques, ont un cycle de l'urée plus actif et présentent une plus grande consommation de tryptophane, ce qui suggère que les cellules à faible passage non immunosuppressives expriment encore certaines de leurs propriétés originales immunosuppressives. Par conséquent, à partir du développement d'un modèle cinétique, nous avons été capables d'identifier des biomarqueurs de l'effet du passage cellulaire pour les cellules souches de la gelée de Wharton. Ces nouvelles connaissances pourront être utiles pour les futures études sur les WJMSC, afin d'identifier spécifiquement des biomarqueurs du caractère immunosuppressif des cellules, tout en prenant en compte l'effet du passage cellulaire conduisant à la sénescence des cellules. Ce travail pourra également être utile pour étudier d'autres types de cellules souches.

ABSTRACT

The immune system, which guarantees the health of an organism, is composed of a set of cells with various functions that participate and regulate the immune response. It is now also well known, from various studies on cancer cells, that some specific cellular mechanisms are programmed to inhibit the immune response, a phenomenon called immunosuppression. The control of the immunosuppression phenomenon could thus lead to major advances for treating various diseases and pathologies in addition to cancer, for instance, by preventing grafts versus host diseases or by limiting the impact of autoimmune diseases. Cell therapy, with the injection of cells having immunosuppressive properties, thus seems a highly promising therapeutic approach. Indeed, some stem cells have showed a high capacity of acquiring immunosuppressive properties under specific culture conditions. Among stem cells with these properties, Wharton's jelly mesenchymal stem cells (WJMSC) also have the quality of being recoverable from the umbilical cord in a non-invasive manner. However, the characterization of the immunosuppressive properties of the cells can only be carried out performing costly and time-consuming manipulations, and the maintain of these stem cells properties after injections remains hazardous. Since time plays against building robust cell injection therapies, it is therefore necessary to set up new tools allowing to rapidly characterize cells immunosuppressive character and to better control (e.g. maintain) the phenotype of interest of post-injection cells. Among recent omics platforms, the study of cell metabolism seemed appropriate to characterize WJMSC cells immunosuppressive traits, and expected to bring new candidate biomarkers of WJMSC phenotype evolution. Indeed, the cell metabolome is at the interface between the genome and the proteome, both determining cell phenotype. Given the complexity of the metabolism, it was necessary to implement computer techniques for the rapid analysis of intracellular enzymatic reactions network dynamics.

To address this issue of better characterizing WJMSCs phenotype, the objective of this study was to identify biomarkers of immunosuppressive characters of Wharton's jelly stem cells. Thus, since WJMSCs lose their immunosuppressive properties with the cell passage number, a comparison of low and high passages number cells was performed. However, the potential bias associated with advanced senescence of high passage cells has to be considered first. The present work therefore focus comparing low and high passage WJMSC, both non-immunosuppressive, developing a kinetic model to simulate both cells age metabolism. The structure of the metabolic

network studied was based on previous modeling work carried out on mammalian cells and supplemented by the addition of metabolic pathways specifically involved in the immunosuppression phenomenon. Therefore, analysing WJMSC cultures at different passages, at low (4 passages) and high (9 passages), a first kinetic model was developed, describing the average behavior of the cells. Then the sensitive parameters of this model were highlighted analysing the global simulation error of the model. Finally, by modifying these sensitive parameters only, two models have been developed describing distinctively cells metabolism of low and high passage. Comparing the two models provided valuable information on reaction fluxes and metabolites concentrations behaviours, and thus allowed identifying distinct biomarkers.

We thus here clearly show that the number of cell passages leads to a slower cell growth as well as a higher cell energetic demand. Reaching high passage number, cells mainly redirect a glycolytic flow towards the TCA cycle and produce less lactate, have a higher ATP turnover rate and produce their ATP mostly via oxidative phosphorylation (i.e. cellular respiration) instead of glycolysis. On the contrary, low passage cells mainly use glycolysis to meet their energy needs, have a more active urea cycle and show a greater consumption of tryptophan, both phenomena which suggest that non-immunosuppressive low passage cells still express some of their immunosuppressive original properties. Therefore, from the development of a kinetic model, we have been able to identify biomarkers of the passage effect for Wharton's jelly stem cells. This new knowledge can be useful in future studies on WJMSCs, to specifically identify biomarkers of the cells immunosuppressive character while accounting for the passage effect which leads to cell senescence. The work can also be useful to studying other stem cells.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE.....	III
REMERCIEMENTS	IV
RÉSUMÉ.....	V
ABSTRACT	VII
TABLE DES MATIÈRES	IX
LISTE DES TABLEAUX.....	XII
LISTE DES FIGURES.....	XIII
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XV
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
Objectif et méthodologies	3
Organisation du mémoire	4
CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE	6
2.1 Le métabolisme : responsable de l'immunosuppression.....	6
2.1.1 Le rôle de l'arginine et de ses dérivés : le cycle de l'urée	7
2.1.2 Les effets du L-tryptophane	10
2.1.3 La prostaglandine-E2, un régulateur de cytokines	13
2.2 Les caractéristiques métaboliques des cellules immunosuppressives.....	17
2.2.1 Les MDSC : gardes du corps des cellules cancéreuses	17
2.2.2 Les cellules présentatrices d'antigènes	19
2.2.3 Les cellules souches	21
2.3 Les méthodes de modélisations du métabolisme	23
2.3.1 Modélisation des flux métaboliques en régime stationnaire	23
2.3.2 Modélisation dynamique	27

2.3.3	La modélisation comme outil de caractérisation du comportement cellulaire.....	35
CHAPITRE 3 ARTICLE1: IDENTIFYING BIOMARKERS OF WHARTON’S JELLY		
MESENCHYMAL STEM CELLS USING A DYNAMIC METABOLIC MODEL: THE CELL		
PASSAGE EFFECT..... 39		
3.1	Présentation de l'article.....	39
3.2	Abstract	40
3.3	Introduction	41
3.4	Materials and methods	43
3.4.1	Wharton’s Jelly Mesenchymal stem cells culture	43
3.4.2	Mixed Lymphocyte Reaction (MLR) Method	43
3.4.3	Intracellular metabolites extraction.....	44
3.4.4	Nucleotides concentration	44
3.4.5	Organic acids concentration.....	45
3.4.6	Extracellular amino acids concentration	45
3.4.7	Extracellular nitric-oxide analysis.....	46
3.4.8	Metabolic model structure.....	46
3.5	RESULTS AND DISCUSSION	49
3.5.1	WJMSCs exhibit non-significantly different immunosuppressive phenotypes comparing P4 and P9 passage cells.....	49
3.5.2	WJMSC P4 and P9 passage cells show distinct metabolic behaviours.....	50
3.5.3	P4 cells present a faster doubling time than late P9 passage cells	54
3.5.4	P4 cells present a more active metabolism than P9 passage cells.....	56
3.5.5	P9 cells maintain a higher TCA activity	64
3.5.6	P9 cells support a higher ATP turnover rate than P4 cells.....	68
3.5.7	Urea cycle activity is higher in P4 cells	72

3.5.8	P4 cells show a lower need in extracellular tryptophan	76
3.6	Conclusion.....	78
3.7	APPENDIX A	79
3.8	APPENDIX B	82
3.9	APPENDIX C	84
3.10	References	85
3.11	Supplementary Materials.....	89
CHAPITRE 4	DISCUSSION GÉNÉRALE	123
4.1	Effet de l'âge cellulaire sur le métabolisme	123
4.2	La structure du modèle inclue les mécanismes immunosuppresseifs	125
4.3	Validité du modèle	127
CHAPITRE 5	CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS.....	129
BIBLIOGRAPHIE		131

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1: Équation des phénomènes d'inhibition et d'activation	30
Tableau 2.2: Équations du taux de croissance spécifique	32
Table 3.1: Values of sensitive parameters according to cell passage.....	53
Table 3.2: Experimental and model simulated specific growth rates	55
Table 3.3: Reaction equations	89
Table 3.4: Successive steps for model calibration	92
Table 3.5: Initial values of metabolites	95
Table 3.6: Parameter values for average simulation	98
Table 3.7: MRM transition and retention time of each amino acid	103
Table 3.8: Flux equations	105
Table 3.9: Metabolite concentrations differential equations	115

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1: Le cycle de l'urée	8
Figure 2.2: Métabolisme du tryptophane	11
Figure 2.3: Métabolisme de la prostaglandine E2	13
Figure 2.4: Effet de la prostaglandine E2 sur les cellules du système immunitaire.....	16
Figure 2.5: Influence des MDSC sur les cellules du système immunitaire.....	19
Figure 2.6: Représentation des flux d'un réseau métabolique.....	24
Figure 2.7: Mécanisme d'une activation non essentielle	31
Figure 3.1: The metabolic network	48
Figure 3.2: MLR data of WJMSC cells.....	49
Figure 3.3: Sensibility analysis results for the 31 most sensitive parameters.	51
Figure 3.4: Effect of cell passage on cell growth.	54
Figure 3.5: Model simulation of cells specific growth rate.....	55
Figure 3.6: Effect of cell passage on glycolysis and pentose phosphate pathways intermediates concentration.	56
Figure 3.7: Glycolysis fluxes of WJMSC.	59
Figure 3.8: Glycolysis flux distribution.	60
Figure 3.9: Fluxes of PPP.....	62
Figure 3.10: Flux distribution in PPP.....	63
Figure 3.11: Effect of cell passage on TCA cycle intermediates concentration.	65
Figure 3.12: TCA intermediates flux profile.....	67
Figure 3.13: Total ATP turnover rate of early and late passage cells.	69
Figure 3.14: Distribution of ATP turnover origin between glycolysis, TCA cycle and oxidative phosphorylation.	70

Figure 3.15: Effect of cell passage on energetic nucleotides ratio.....	71
Figure 3.16: Effect of cell passage on urea cycle intermediates.	72
Figure 3.17: UREA cycle fluxes.	74
Figure 3.18: Effect of cell passage on tryptophan consumption.	76
Figure 3.19: ETRP metabolism fluxes.	77
Figure 3.20: Experimental data and model simulation of cofactors and nucleotides concentrations.	93

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

AA	Acide arachidonique
AEQS	Approximation des équilibres quasi-stationnaires
AMPK	AMP-activated protein kinase
APC	Cellules présentatrices d'antigène
ARG	L-arginine
ARG1	Arginase
AS	Argininosuccinate
ASS	Argininosuccinate synthétase
BMMSC	Cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuses
cAMP	Cycline AMP
CD3 ζ	Chaîne ζ
cdk4	Cycline-dependent kinase 4
COX	Cyclooxygénase
CP	Carbamoylphosphate
CPS	Carbamoyl phosphate synthetase
CTR	L-citrulline
DC	Cellules dendritiques
DMFA	Analyses dynamiques de flux métaboliques
EFM	Flux des modes élémentaires
eIF2 α	Translation initiation factor 2 α
ES	Cellules souches d'embryon
FBA	Analyse des balances de flux
GCN2	General control nonderepressible 2

G-MDSCs	MDSC granulocytes
GvHD	Rejet de greffe
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HUCPVC	Cellules périvasculaires du cordon ombilical
IDO	Indoleamine 2,3-dioxygenase
IL	Interleukine
IL-2	Interleukine-2
IMC	Cellules myéloïdes immatures
iPS	Cellules souches pluripotentes induites
JAK1	Janus activated kinase 1
K-dMFA	Analyse cinétiques des flux métaboliques dynamiques
Kyn	Kynurenine
MCA	Analyse du contrôle métabolique
MDSC	Cellules suppressives dérivées de la myéloïde
MFA	Analyse des flux métaboliques
MIF	Facteurs d'inhibition de la migration des macrophages
M-MDSCs	MDSC monocytes
MPA	Analyse des voies métaboliques
MSC	Cellules souches mésenchymateuses
mTORC1	Mechanistic target of rapamycin complex 1
NH ₄	Ammonium
NK	cellules « <i>Natural killer</i> »
NO	Oxyde nitrique
NOS	Oxyde nitrique synthétase

OCT	Ornithine carbamoyltransferase
ONOO ⁻	Peroxonitrique
ORN	L-ornithine
PGE ₂	Prostaglandine E2
PGG ₂	Prostaglandine G2
PGH ₂	Prostaglandine H2
RNS	Espèces azotées réactives
ROS	Espèces oxygénées réactives
SC	Cellules souches
STAT5	Signal transducer and activator of transcription
TAM	Macrophages associés à la tumeur
TC	Lymphocytes-T cytotoxiques
TCR	Récepteur des cellules T
TH	Lymphocytes-T « helpers »
TNF- α	Facteur de nécrose tumorale α
Treg	Lymphocytes-T régulateurs
WJMSC	Cellules souches mésenchymateuses de la gelée de Wharton

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

Le système immunitaire est le garant de la protection de l'organisme contre l'invasion de tous corps extérieurs. Son fonctionnement est complexe et s'organise autour de deux grandes étapes, l'immunité innée et l'immunité adaptative. La réponse immunitaire est effectuée par différents types de cellules spécialisées ayant chacune des fonctions complémentaires, les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes. Ce système immunitaire est constamment régulé par des cytokines, molécules sécrétées servant de moyen de communication entre les différents effecteurs de la réponse immunitaire (Belardelli, 1995). Ces cytokines peuvent être inflammatoires et provoquer l'activation de la réponse immunitaire ou au contraire, anti-inflammatoires et en diminuer les effets. Un équilibre s'établit donc dans l'organisme en vue de répondre de manière proportionnée à l'intrusion d'un pathogène sans pour autant affecter les cellules saines. Un dysfonctionnement de cet équilibre peut conduire à de nombreuses maladies. D'une part une surexpression des cytokines inflammatoires a été identifiée comme la principale cause de maladies auto-immunes telle que la sclérose en plaque (Steinman, 1996) ou le rejet de greffe (Ferrara, Levine, Reddy, & Holler, 2009). D'autre part, une surexpression de cytokines anti-inflammatoires induit une déficience du système immunitaire, l'empêchant d'éliminer les pathogènes ou encore les cellules infectées ou non conformes telles que celles composant les tumeurs (Serafini, Borrello, & Bronte, 2006). L'étude et la maîtrise du comportement de ces cellules pourraient donc permettre le développement de méthodes altérant la réponse immunitaire afin de prévenir ces maladies ou pathologies. Le présent projet de maîtrise s'est donc focalisé sur les phénomènes réduisant la réponse et le niveau de réaction du système immunitaire, soit le phénomène de l'immunosuppression, une approche thérapeutique en vogue et suscitant de grands espoirs d'offrir une solution à des problèmes complexes. La suite de ce mémoire portera donc sur ce sujet.

L'idée d'utiliser la thérapie cellulaire pour contrer les maladies auto-immunes est née de l'observation de cellules suppressives dérivées de la myéloïde (MDSC) protégeant les tumeurs contre le système immunitaires (Dazzi, van Laar, Cope, & Tyndall, 2007). De nombreuses cellules présentent cette capacité de devenir immunosuppressives, comme les macrophages (Munn et al., 1999) ou les MDSC (Gabrilovich & Nagaraj, 2009), mais également les cellules souches mésenchymateuses (MSC) (Ghannam, Bouffi, Djouad, Jorgensen, & Noël, 2010). De

grands espoirs reposent sur l'utilisation des MSCs car les méthodes pour les extraire du corps humain sont déjà bien maîtrisées et leur rapide cycle de division permet de les amplifier en culture *in vitro*, comparativement à de nombreuses autres cellules différenciées. Fait d'intérêt, ces cellules immunosuppressives ne possèdent pas à leur surface les molécules initiant une réponse immunitaire et présentent donc une faible immunogénicité (Majumdar et al., 2003). Plus récemment, les cellules souches de la gelée de Wharton (WJMSCs) ont montré des propriétés similaires et ont donc suscité un vif intérêt. En effet, ces cellules souches, situées dans le cordon ombilical, peuvent être extraites de manière non invasive et possèdent les mêmes propriétés que les cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse (BMMSC) (Chen, Lie, Li, & Wei, 2009). L'utilisation de ces cellules souches, une fois injectées à un patient victime d'une forte réaction auto-immune, pourraient donc permettre la réduction de la réponse immunitaire à un niveau local, au niveau d'une greffe par exemple, sans pour autant affecter le système immunitaire dans les autres parties de l'organisme. Une série d'expériences a ainsi été effectuée avec ces cellules avec un niveau de succès prometteur (Katarina Le Blanc et al., 2004). Cependant, comme pour toutes thérapies cellulaires, la maîtrise du comportement cellulaire suite à une culture *in vitro* demeure un défi important, limitant pour l'instant en grande partie l'implantation de ces thérapies. En effet, une fois dans l'organisme, les cellules devront être immunosuppressives avec certitude afin de ne pas induire d'effets secondaires pathologiques néfastes. Il est donc nécessaire pour cela de pouvoir parfaitement caractériser l'état du comportement cellulaire avec des biomarqueurs fiables du caractère immunosuppressif.

Le comportement d'une cellule peut être décrit à plusieurs niveaux. D'une part le transcriptome, qui regroupe l'ensemble des ARN transcrits de l'ADN cellulaire, permet d'étudier les variations de concentration de ces vecteurs de production de protéines (i.e. enzymes) en fonction des besoins et du comportement de la cellule. Ensuite, le protéome et le sécrétome, c'est-à-dire l'ensemble des protéines présentes (i.e. leur niveau d'activité et leur concentration) dans la cellule et assurant l'activité enzymatique ou qui sont sécrétées hors de cellules. Enfin, le métabolome, composé de toutes les molécules organiques de la cellule, les métabolites, qui sont sans cesse consommés ou produits par les réactions catalysées par les enzymes. Parmi ces trois niveaux, le métabolome semble le plus adapté pour identifier un changement de comportement ou l'acquisition de propriétés fines de cellules (Stelling, Klamt, Bettenbrock, Schuster, & Gilles, 2002). Le métabolome semble en effet être affecté par le moindre changement subtil du

comportement cellulaire comme le montre Panopoulos et al. (Panopoulos et al., 2012) pour les cellules ou encore Fiehn et al. (Fiehn, 2002) pour un biosystème. L'étude du métabolisme semble donc à même de fournir des biomarqueurs pouvant révéler ou qualifier les propriétés immunosuppressives des cellules. Néanmoins, malgré le développement de nombreuses techniques de mesure des métabolites intra et extracellulaires, le réseau métabolique reste un système très complexe.

Dans le but d'obtenir une vision claire et globale du métabolisme cellulaire, un grand nombre de recherches ont été effectuées afin de modéliser mathématiquement les flux des réactions biochimiques du métabolome. Des techniques de modélisation, comme l'analyse des flux métaboliques (MFA) ou l'analyse des balances de flux (FBA) ont été mises en place initialement pour les bactéries par Vallino et al. (Vallino & Stephanopoulos, 1989), puis pour les cellules de mammifères CHO (Ahn & Antoniewicz, 2011; Goudar et al., 2010; Sengupta, Rose, & Morgan, 2011). Ces méthodes décrivent bien les flux métaboliques de la cellule sur les différentes principales voies métaboliques. Cependant, ces techniques se placent dans le cas d'un système en régime stationnaire et ne décrivant donc pas le dynamisme cellulaire. Plus récemment, de nouveaux modèles ont été développés afin d'intégrer une composante dynamique en prenant en compte la variation en concentrations extracellulaires en métabolites (Nolan & Lee, 2011), ou également intracellulaires (Ghorbaniaghdam, Chen, Henry, & Jolicoeur, 2014; Ghorbaniaghdam, Henry, & Jolicoeur, 2013; Robitaille, Chen, & Jolicoeur, 2015). Ces analyses dynamiques de flux métaboliques (dMFA) permettent de modéliser plus précisément l'état d'une cellule et donc de rapidement déceler un changement de comportement. Cependant, l'utilisation d'un modèle dynamique n'a jamais été réalisée pour caractériser les propriétés immunosuppressives d'une cellule souche. La réalisation d'un tel modèle pourrait permettre une meilleure compréhension des mécanismes métaboliques de l'immunosuppression ainsi que la découverte de biomarqueurs responsables de ces propriétés, afin d'améliorer les méthodes de sélections de cellules pour de futures thérapies cellulaires.

Objectif et méthodologies

L'objectif premier de ce projet est de montrer la capacité d'un modèle dynamique d'analyse des flux métaboliques à caractériser les cellules souches mésenchymateuses de la gelée de Wharton immunosuppressives et d'utiliser le modèle pour identifier un biomarqueur traduisant ce

phénotype. Or, nous nous sommes aperçus au cours de la réalisation de ce projet que les deux lots de WJMSCs, aux passages 4 et 9, reçus de notre collaboratrice de l'Hôpital d'Ottawa, la Dr. Caryn Ito, ne présentaient que de faibles traits immunosuppresseurs (non statistiquement différents). L'analyse des résultats a donc été réorientée sur l'identification de traits reliés à l'âge des cellules, i.e. le nombre de passages suite à leur isolation de cordon ombilical; un passage représentant une étape de culture lors de laquelle un cycle de croissance est exécuté avec une courte latence, une phase exponentielle et le début de confluence. Pour ce faire, deux grandes étapes ont été réalisées. Tout d'abord, la culture des WJMSCs immunosuppresseurs ainsi que la mesure des concentrations intra et extracellulaires ont été réalisées. Il est à noter que les cellules étudiées ont été initialement prélevées à l'Hôpital Général d'Ottawa, puis mises en culture en conditions inflammatoires afin de déclencher un possible comportement immunosuppresseur. Pendant trois jours, à intervalle de temps régulier, les cellules et le milieu de culture ont été collectés et les métabolites intracellulaires ont été extraits pour quantification. Après analyse, l'évolution temporelle des concentrations des métabolites intra et extracellulaires a été déterminée. Dans une seconde partie, la modélisation du réseau métabolique a été réalisée. Pour cela, la structure du modèle métabolique a été déterminée à partir de travaux récents au laboratoire (Robitaille et al., 2015) en ajoutant les réactions biochimiques liant des métabolites connus impliqués dans le phénomène d'immunosuppression. Le modèle a ensuite été calibré en suivant la méthode de Rizzi et al. (Rizzi, Baltes, Theobald, & Reuss, 1997) à l'aide d'une approximation de la concentration des métabolites par des fonctions mathématiques non significatives biologiquement et du remplacement, pas à pas, de ces fonctions par les fonctions cinétiques réelles aux paramètres cinétiques déterminés.

Organisation du mémoire

Le corps du mémoire est divisé en trois chapitres. Le premier chapitre est consacré à une revue de littérature portant sur le rôle du métabolisme dans le phénomène d'immunosuppression ainsi que sur les méthodes d'analyses du métabolisme cellulaire. Cette revue abordera tout d'abord les différents métabolites impliqués dans l'immunosuppression et leurs actions sur le système immunitaire. Par la suite, l'état actuel des connaissances sur les cellules immunosuppresseurs de l'organisme sera couvert. Finalement les méthodes utilisées pour décrire les vitesses de réactions biochimiques et pour quantifier les flux métaboliques seront passées en revue. Le second chapitre

est constitué du manuscrit intitulé *Identifying biomarkers of Wharton's jelly mesenchymal stem cells using a dynamic metabolic model: the cell passage effect* soumis au journal *Metabolites* pour l'édition spéciale *metabolomics modelling*. Ce chapitre présente la structure du modèle métabolique développé, les principaux résultats expérimentaux obtenus dans le cadre de ce mémoire ainsi que leurs interprétations et analyses. Un dernier chapitre présente la discussion générale sur l'ensemble des travaux réalisés. Finalement, le corps de ce mémoire sera suivi d'une conclusion, et des recommandations sont apportées sur les directions futures à suivre dans la poursuite de ce travail.

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE

La présente revue de littérature s'intéressera tout particulièrement aux rôles des métabolites dans l'expression des propriétés immunosuppressives des cellules ainsi qu'à l'utilisation d'un modèle mathématique, décrivant le réseau métabolique, comme outils d'identification de biomarqueurs métaboliques de l'immunosuppression. Dans un premier temps, les métabolites responsables de l'immunosuppression, les différentes voies métaboliques impliquées ainsi que leur mode d'action à l'encontre du système immunitaire seront présentés. Par la suite, la revue portera sur les cellules pouvant affecter le comportement de la réponse immunitaire, les modifications de leur réseau métabolique nécessaire à l'acquisition de ces propriétés, et la manière dont ces modifications sont induites par l'environnement. Enfin, les méthodes de modélisation mathématique d'un réseau métabolique seront détaillées ainsi que leur utilisation comme outils d'identification efficace de biomarqueurs et de caractérisation d'organisme cellulaire. Finalement, le contexte du projet de recherche sera présenté.

2.1 Le métabolisme : responsable de l'immunosuppression

L'étude de l'immunosuppression a commencé avec l'observation de la capacité de tumeurs à résister à la réponse immunitaire de l'organisme. Les premières méthodes pour contrecarrer ce phénomène consistaient à améliorer la détection et l'efficacité du système immunitaire via vaccination. Cependant ces méthodes se sont rapidement révélées être inefficaces (Rosenberg, Yang, & Restifo, 2004). De nombreuses théories ont donc été développées afin d'expliquer l'échappatoire des tumeurs : perte d'antigènes ou de molécules clefs dans la détection du système immunitaire, recrutement de cellules protectrices ou modification de l'environnement local en vue d'empêcher la prolifération des lymphocytes. Plus récemment, il est apparu que l'environnement des tumeurs n'était pas viable pour les lymphocytes T (Whiteside, 1999). L'hypothèse la plus probable semble donc que certaines cellules spécifiques en périphérie des tumeurs arrivent à modifier leur microenvironnement afin d'inhiber la réponse immunitaire via la sécrétion de molécules particulières, dont des métabolites. La concentration des métabolites dans l'environnement des cellules du système immunitaire a en effet un impact sur leur capacité fonctionnelle. De nombreuses voies métaboliques semblent ainsi impliquées dans l'altération du microenvironnement tumoral et semblent conduire au phénomène d'immunosuppression. Les principales voies métaboliques seront détaillées dans cette partie.

2.1.1 Le rôle de l'arginine et de ses dérivés : le cycle de l'urée

L-arginine est un acide-aminé grandement étudié depuis qu'il a été synthétisé pour la première fois à la fin du 19^{ème} siècle à partir de plants de lupin (Schulze & Steiger, 1887). Aujourd'hui, l'ensemble des réactions chimiques de métabolisme ou de catabolisme dans lequel il est impliqué est parfaitement déterminé (Guoyao & Morris, 1998).

2.1.1.1 Les réactions biochimiques liées à l'arginine

L-arginine est principalement impliqué dans le cycle de l'urée (Figure 2.1). Il est majoritairement dégradé par l'enzyme arginase (ARG1) pour produire de l'urée et du L-ornithine (ORN), et par l'oxyde nitrique synthétase (NOS) qui produit de l'oxyde nitrique (NO) et de la L-citrulline (CTR). Cette citrulline sera elle-même dégradée par l'argininosuccinate synthétase (ASS), une enzyme produisant de l'argininosuccinate (AS) qui pourra par la suite servir de substrat avec l'aspartate pour régénérer la L-arginine (ARG) ainsi que du fumarate (FUM). De plus, l'action de l'ornithine carbamoyltransferase (OCT) sur l'ornithine et le carbamoylphosphate (CP) conduit à synthétiser également de la L-citrulline. Ce carbamoylphosphate est directement produit par la Carbamoyl phosphate synthétase (CPS) qui prend comme principal substrat l'ammonium (NH_4) (Guoyao & Morris, 1998; Morris Jr, 2002; Wijnands, Castermans, Hommen, Meesters, & Poeze, 2015).

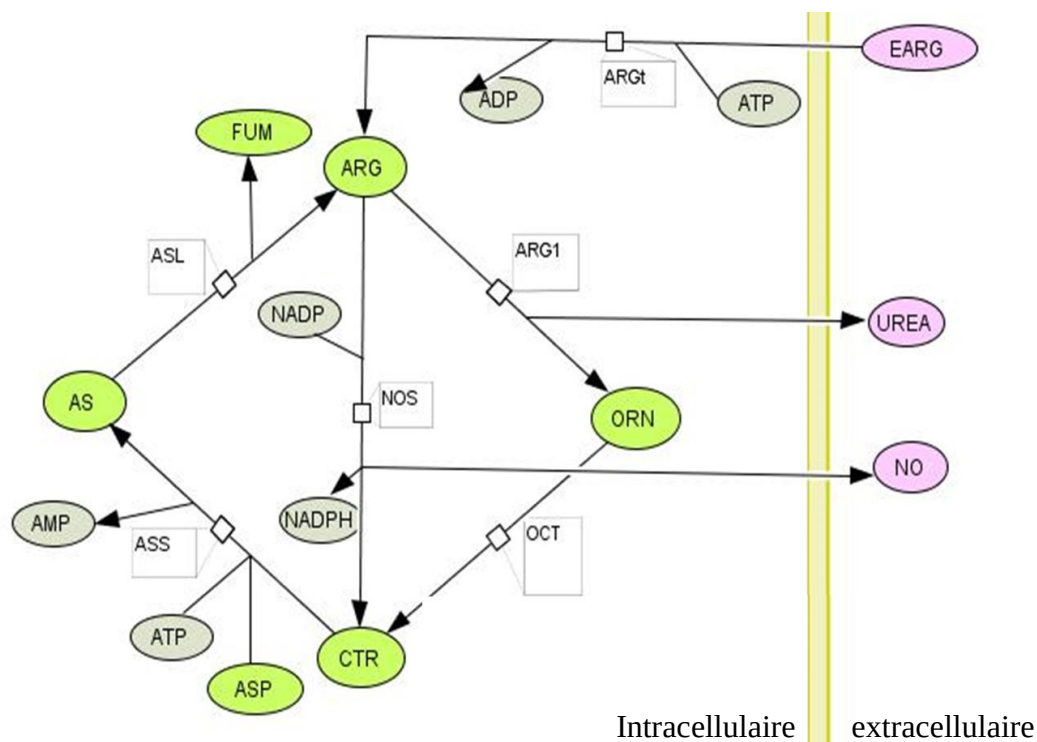


Figure 2.1: Le cycle de l'urée

2.1.1.2 L'immunosuppression par appauvrissement en L-arginine

Le cycle de l'urée précédemment décrit est un acteur majeur du phénomène d'immunosuppression. En effet, il contribue à appauvrir le milieu extérieur en arginine, un acide aminé important pour le développement des cellules de l'immunité. D'une part, lors de la réponse immunitaire innée, les macrophages consomment l'arginine afin de produire des espèces réactives pouvant dégrader les membranes des cellules à éliminer (Pekarova & Lojek, 2015). Un manque d'arginine empêche donc l'action des macrophages. D'autre part, les lymphocytes de la réponse immunitaire secondaire semblent également touchés par une carence en arginine (Wijnands et al., 2015). En effet, l'absence d'arginine conduit à une diminution du signal de transduction des récepteurs d'antigènes des lymphocytes T (TCR) liés à la chaîne ζ (CD3 ζ) (Munder et al., 2013; Rodriguez et al., 2004; Rodriguez et al., 2002). L'Arginine va diminuer grandement le temps de (demi-)vie de l'ARNm de la protéine CD3 ζ dans le cytoplasme (Rodriguez et al., 2002), ce qui va conduire à une diminution de cette protéine CD3 ζ et donc empêcher les lymphocytes T d'effectuer efficacement leur action immunitaire.

De plus, la diminution de l'arginine dans le milieu extracellulaire des lymphocytes T active des modules de détection sensibles à la présence de nutriments. Les deux principales enzymes capables de détecter une baisse de concentration en nutriments sont les kinases *general control nonderepressible 2* (GCN2) et *mechanistic target of rapamycin complex 1* (mTORC1). En détectant le manque d'arginine, ces kinases vont agir sur le métabolisme des lymphocytes et bloquer leur prolifération en phase G0. La diminution d'arginine est ressentie par la kinase GCN2 qui en retour phosphoryle le *translation initiation factor 2 α* (eIF2 α). eIF2 α va par la suite agir sur la cellule en modifiant la synthèse protéique afin de s'adapter aux conditions de stress (Wek, Jiang, & Anthony, 2006). Un ensemble de protéines seront produites en plus petite quantité, parmi elles, la cycline D3 et la cycline-dépendent kinase 4 (cdk4) qui vont avoir directement un impact sur la division cellulaire des lymphocyte T (Rodriguez, Quiceno, & Ochoa, 2007). La cycline D3 est en effet un élément clef de la division cellulaire, sa diminution conduit au blocage du développement cellulaire (Sicinska et al., 2003).

Le manque d'arginine affecte également le cytosquelette des lymphocytes T. En l'absence d'arginine, la déphosphorylation de la protéine cofiline sera inefficace. Or cette protéine est responsable de la polymérisation du réseau d'actine, ce manque va donc détériorer la formation de synapses immunologiques avec les cellules présentatrices d'antigènes (APC), empêchant ainsi le bon déroulement de la réponse immunitaire (Feldmeyer et al., 2012).

2.1.1.3 NO, un produit de dégradation de l'arginine immunosuppresseur

La diminution de l'arginine par les enzymes ARG et NOS a un impact sur le système immunitaire, mais les produits liés à ces réactions ont aussi leurs rôles à jouer. L'un des produits les plus étudiés est l'oxyde nitrique (NO). Son action est très controversée car il est produit à la fois par les cellules immunosuppressives pour réduire la réponse immunitaire mais également par les cellules de l'immunité pour protéger l'organisme. Son action va dépendre de la concentration à laquelle il est présent dans l'environnement (Janakiram & Rao, 2015). Dans le cas de faible concentration (< 50 nM), il aura une action immunosuppressive et agira sur différentes voies métaboliques des cellules (Bronte & Zanovello, 2005).

Dans un premier temps, NO va altérer la cascade de signalisation en provenance du récepteur à l'interleukine-2 (IL-2), soit en favorisant la S-nitrosylation des résidus de cystéines, soit en activant la kinase I β dépendant de la cyclic-GMP (Fischer et al., 2001). NO va également bloquer

cette voie de signalisation en empêchant la phosphorylation de la protéine *signal transducer and activator of transcription* (STAT5) et de *Janus activated kinase 1* (JAK1) (Bingisser, Tilbrook, Holt, & Kees, 1998; Sato et al., 2007). STAT5 est également une protéine du récepteur des cellules T (TCR) qui doit être phosphorylée pour permettre la détection d'antigène. (Welte et al., 1999). En l'absence d'un TCR fonctionnel, les lymphocytes-T vont perdre leur utilité.

L'oxyde nitrique est une espèce très réactive, même s'il est gazeux, NO va immédiatement réagir avec les molécules environnantes. Il va, entre-autres, produire des espèces azotées (RNS) et oxygénées très réactives (ROS) (Bronte & Zanovello, 2005). Ces espèces réactives vont pouvoir aisément traverser les membranes cellulaires et interagir avec les molécules ou protéines intracellulaires. Les RNS vont pouvoir induire une nitration des tyrosines de la structure des protéines. Cette nitration peut affecter différentes activités biologiques comme l'activation ou l'inactivation d'enzymes, la différenciation ou la prolifération cellulaire (Radi, 2004). Il a été démontré que les RNS peuvent à leur tour réagir avec les chimiokines, responsables de la migration des lymphocytes-T vers les pathogènes (Molon et al., 2011). Une fois azotées, ces chimiokines ne pourront plus effectuer leur rôle et les antigènes pourront ainsi échapper à la réponse immunitaire.

L'oxyde nitrique a également un effet sur l'énergétique cellulaire. Il semble que le NO inhibe la respiration cellulaire des lymphocytes-T, conduisant à la diminution de la concentration en ATP intracellulaire (Hammami, Bertrand, et al., 2012).

2.1.2 Les effets du L-tryptophane

Le L-Tryptophane est l'acide aminé le moins abondant, il est de plus essentiel pour l'Homme car il ne peut être produit par les mammifères. La seule source en tryptophane dans l'organisme vient donc de l'alimentation. Il est principalement dégradé par les cellules via l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) en N-formylkynurenine, ce qui constitue la première étape de la voie métabolique des kynurenines. Cette première réaction avec IDO est limitante, par la suite la N-formylkynurenine sera dégradée en Kynurenine (Kyn) (Takikawa, 2005). La Kynurenine pourra ensuite être dégradée en de nombreux produits tels que l'acide kynurenique, l'acide formique, l'acide picolinique ou l'acide quinolinique tel qu'illustré à la Figure 2.2 (Yeung, Terentis, King, & Thomas, 2015).

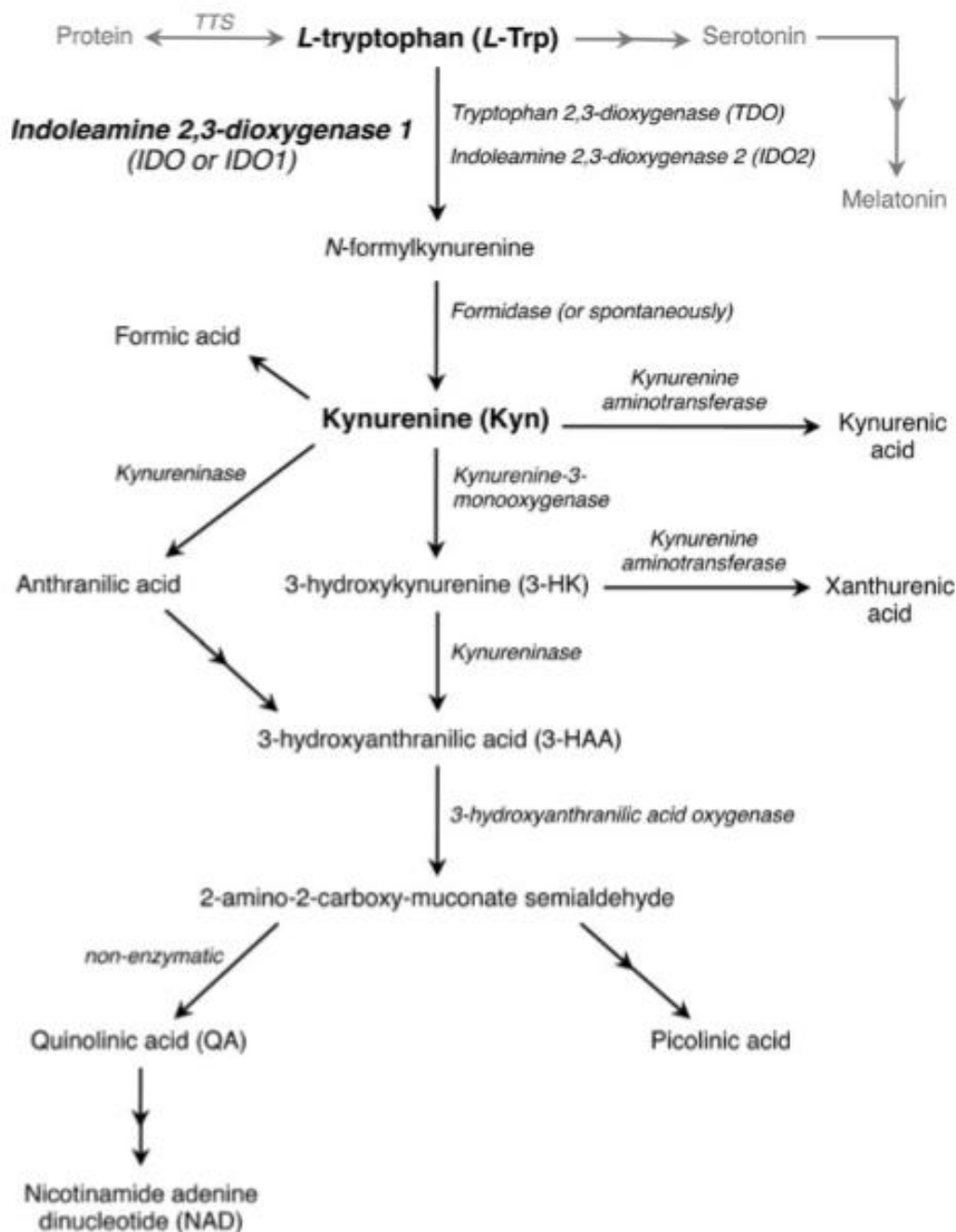


Figure 2.2: Métabolisme du tryptophane

Tirée de Yeung et al. (Yeung et al., 2015)

La réaction de dégradation du tryptophane joue un rôle clef dans le phénomène de l'immunosuppression. Comme avec l'arginine, l'augmentation de la consommation en tryptophane va induire un manque en nutriments pour les cellules de l'immunité et limiter leur

prolifération. La première découverte de la fonction immunosuppressive de l'IDO n'est pas liée à l'étude des cellules immunosuppressives mais à celle des macrophages qui, en consommant le tryptophane, empêchaient les lymphocytes-T d'une mère enceinte de s'en prendre au fœtus (Mellor & Munn, 1999). Ce phénomène traduit un rôle bien plus ancien du métabolisme du tryptophane dans le contrôle de la réponse immunitaire. Il a par la suite été montré que l'absence de L-tryptophane induisait la formation de tRNA non chargés, menant à l'activation de la protéine GCN2 et à l'arrêt du développement des lymphocytes-T comme dans le cas de l'arginine (Munn et al., 2005). De plus, cette activation de GCN2 a également pour effet de sous-réguler la chaîne du TCR CD3 ζ ce qui empêche la détection des antigènes par les lymphocytes-T. (Fallarino et al., 2006). Ce manque de tryptophane conduit aussi à une différenciation des lymphocytes-T en lymphocytes-T régulateurs.

Les produits de dégradation du tryptophane jouent aussi un rôle dans l'immunosuppression. Parmi eux, l'acide quinolitique, la 3-Hydroxykynurenine et l'acide 3-Hydroxyanthranilique sont des neurotoxines potentielles. Il a été montré qu'ils étaient, entre-autres, responsables de l'apoptose des lymphocytes-Th1 (Fallarino et al., 2003). Un autre dérivé du tryptophane, l'acide picolinique, a également un effet sur les lymphocytes-T. Sans modifier les fonctions de sécrétions de cytokines, ce dérivé ne réduit que très peu la prolifération des lymphocytes, mais modifie leur métabolisme et empêche les lymphocytes naïfs de se différencier en lymphocytes-T-CD4+. (Prodinger et al., 2016).

2.1.3 La prostaglandine-E2, un régulateur de cytokines

Les prostaglandines sont un groupe de lipides ayant divers rôles hormonaux à travers l'organisme. Leurs synthèse et métabolisme ont été élucidées par Hamberg et Samuelsson en 1973 (Hamberg, Svensson, & Samuelsson, 1974). Brièvement, les prostaglandines sont des dérivées de l'acide arachidonique (AA) et sont produits via la cyclooxygénase (COX) (Simmons, Botting, & Hla, 2004). Cette enzyme synthétisera en premier lieu la prostaglandine G₂ (PGG₂) puis la prostaglandine H₂ (PGH₂). Par la suite, des enzymes spécifiques métaboliseront la PGH₂ en différents types de prostaglandines dont la prostaglandine E₂ (PGE₂) tel qu'illustré à la Figure 2.3.

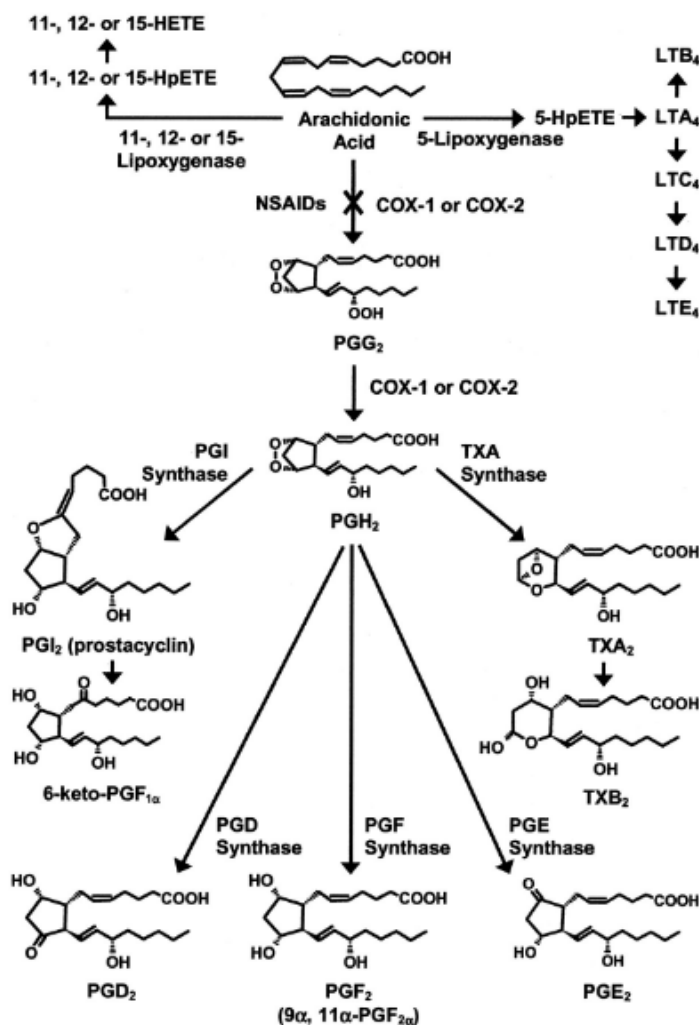


Figure 2.3: Métabolisme de la prostaglandine E2

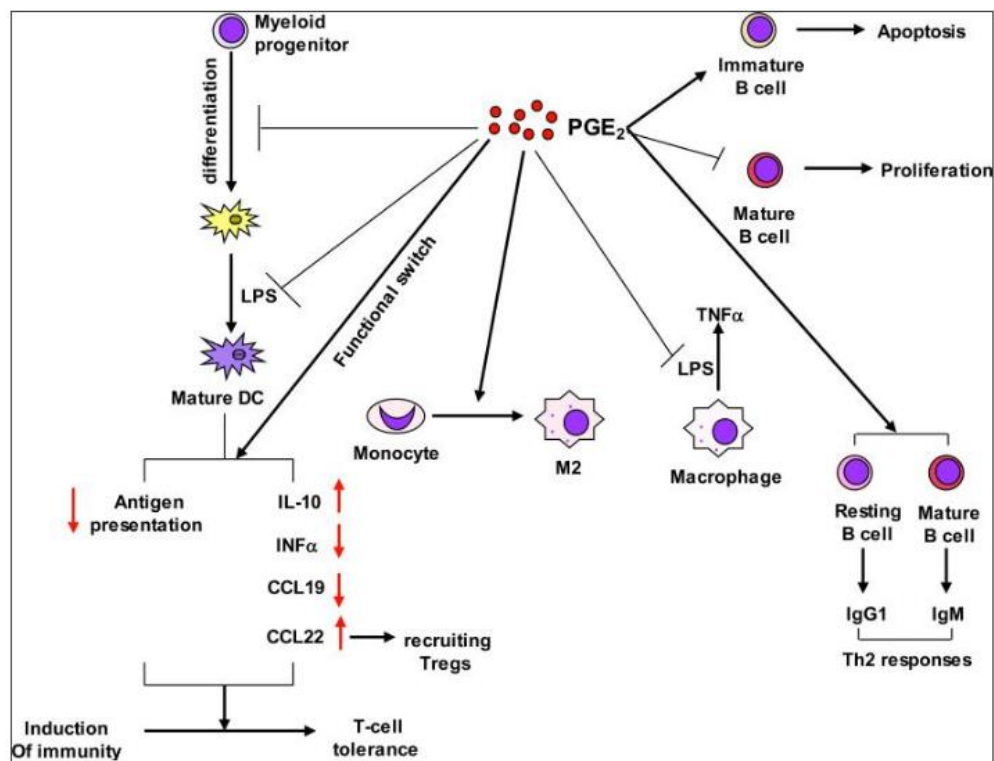
Tirée de Simmons et al. (Simmons et al., 2004)

L'action de la prostaglandine E2 sur le système immunitaire a été grandement étudiée, et les résultats tendent à montrer que cette prostaglandine est un modulateur de la réponse immunitaire. En d'autres termes, la prostaglandine E2 va orienter le système immunitaire pro-inflammatoire vers un système anti-inflammatoire. La revue de littérature de Sarah G Harris et al. (Harris, Padilla, Koumas, Ray, & Phipps, 2002), celle de Vinatha Sreeramkumar et al. (Sreeramkumar, Fresno, & Cuesta, 2012) ou encore celle de Dingzhi Wang et Raymond N. Dubois (D. Wang & DuBois, 2013) reprennent bien l'ensemble des découvertes qui ont été faites à ce sujet. Brièvement, la prostaglandine E2 influence chaque effecteur de la réponse immunitaire.

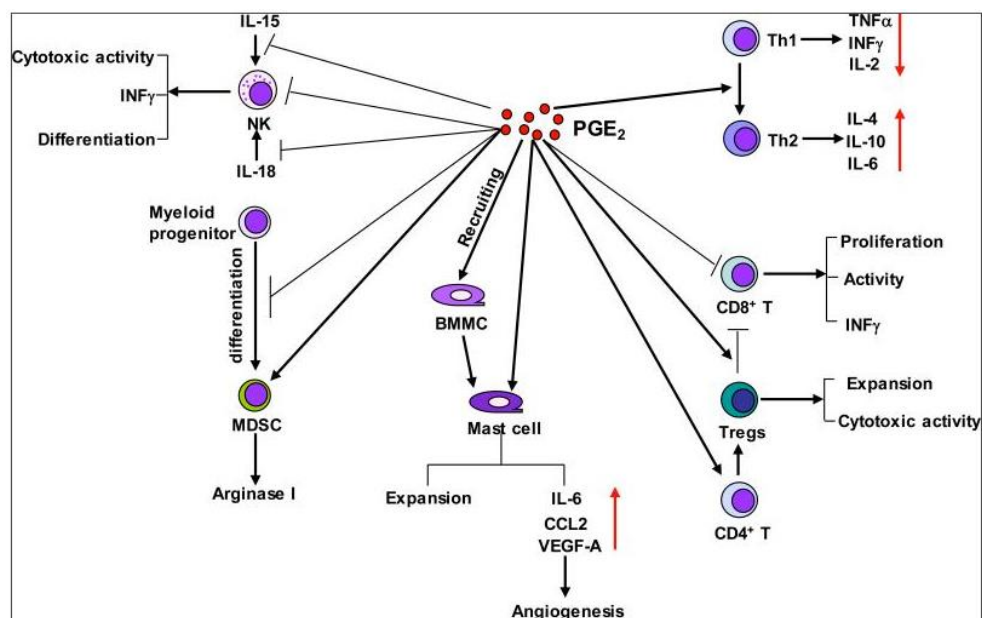
Au niveau des lymphocytes-T « helpers » (TH), elle va favoriser les TH2 et donc la production des interleukines (IL) 4, 5 et 13, et réduire l'action des TH1 en inhibant la production des IFN- γ et IL-2. (Betz & Fox, 1991; Snijdwint, Kaliński, Wierenga, Bos, & Kapsenberg, 1993). La prostaglandine a pour effet d'augmenter la production de la cycline AMP (cAMP) dans les cellules TH, via l'action du récepteur EP2. Cette augmentation de cAMP active la kinase Adénylyl qui par la suite inhibe la production d'IL-2 et d'IFN- γ en parallèle (Rappaport & Dodge, 1982; Uotila, 1996). De plus, l'action de cette kinase va bloquer les tunnels d'ions K⁺ et dénaturer la transduction du signal via les protéines G, ce qui va empêcher les lymphocytes-T de s'activer (Bastin, Payet, & Dupuis, 1990). La PGE2 va également influencer les lymphocytes-T cytotoxiques (TC). Elle va agir sur les lymphocytes-T-CD4⁺ pour les amener à produire l'interleukine IL-17 et réduire leur production de IFN- γ , cela va amener les lymphocytes-T à se différencier préférentiellement en TH17 (Napolitani, Acosta-Rodriguez, Lanzavecchia, & Sallusto, 2009). La PGE2 va aussi inhiber les récepteurs des lymphocytes-T-CD8⁺ par la régulation des complexes CD94 et NKG2A via cAMP (Zeddou et al., 2005). En plus des lymphocytes-T, les lymphocytes-B vont également être influencées par la PGE2. Grâce aux récepteurs EP2 et EP4, la PGE2 va induire un changement de comportement chez les lymphocytes-B et les contraindre à sécréter des anticorps de type IgE caractéristiques d'une réponse immunitaire de type TH2 (Fedyk & Phipps, 1996). Il en est de même pour les cellules dites *natural killer* (NK). Ces cellules sont complètement inhibées par l'action de la PGE2 (Yakar et al., 2003). La PGE2 empêche également les NK de produire des IFN- γ , cytokines essentielles pour réaliser leur fonction d'élimination des pathogènes (Walker & Rotondo, 2004).

Les cellules présentatrices d'antigène (APC) ne sont pas exclues de ce processus. La prostaglandine E2 va également avoir une influence sur les macrophages. Ces derniers peuvent

être à la fois en phase M1 et sécréter des cytokines pro-inflammatoires comme le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α), IL-12 ou IL-23, ou au contraire sécréter des cytokines anti-inflammatoires comme IL-10, IL-4 ou IL-13. La présence de PGE2 semble orienter les macrophages vers la phase M2, anti-inflammatoire. Il a été démontré que la présence de prostaglandine dans le milieu des macrophages conduit à la diminution de sécrétion de TNF- α (Kunkel, Wiggins, Chensue, & Larrick, 1986). De même, une diminution de l'IL-12 et une augmentation d'IL-10 ont été remarquées lors de l'ajout de PGE2 (Van der Pouw Kraan, Boeijs, Smeenk, Wijdenes, & Aarden, 1995). Il en est de même pour les cellules dendritiques (DC). L'action de la prostaglandine va les conduire à drastiquement diminuer leur production en IL-12 et augmenter celle d'IL-10 (Kaliński, Hilken, Snijders, Snijdwint, & Kapsenberg, 1997). En présence de PGE2, les DCs vont donc induire une réponse immunitaire de type humorale via les TH2. De plus, l'action de la prostaglandine va empêcher les DC de s'infiltrer dans la tumeur et de s'activer afin d'amorcer la réponse immunitaire (Zelenay et al., 2015). D'une manière générale, la PGE2 induit une déficience de la réponse immunitaire en partie parce qu'elle empêche les cellules dendritiques de se différencier et de devenir mature en modifiant les cytokines qu'elles secrètent (D. Wang & DuBois, 2013). En plus des cellules dendritiques, les lymphocytes-B (LB) sont également des APC pouvant en plus sécréter des anticorps. Les lymphocytes-B sont aussi sujets aux effets de la prostaglandine-E2. La PGE2 va en effet induire l'apoptose des LB immatures et inhiber la prolifération des LB matures. De plus, PGE2 modifie le type d'anticorps sécrété par les LB : Les LB non actifs seront amenés à sécréter des anticorps IgG1 et les actifs des anticorps IgE (D. Wang & DuBois, 2013). Ces orientations montrent encore une fois que la prostaglandine-E2 conduit le système immunitaire vers une réponse humorale. L'ensemble de ces actions sont résumées à la Figure 2.4.



(a)



(b)

Figure 2.4: Effet de la prostaglandine E2 sur les cellules du système immunitaire

Tirée de D. Wang & DuBois (D. Wang & DuBois, 2013)

2.2 Les caractéristiques métaboliques des cellules immunosuppressives

La section précédente s'est concentrée sur le rôle de trois voies métaboliques clefs dans le phénomène d'immunosuppression, soit : le cycle de l'urée avec l'action de l'arginase (ARG) et de l'oxyde nitrique synthétase (NOS), la dégradation du tryptophane via l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) et l'influence de la prostaglandine E2 (PGE2) synthétisée par la cyclooxygénase (COX). La présente section présentera en détail les types de cellules qui ont un impact immunosuppressif sur le système immunitaire, et les mécanismes qu'elles utilisent, entre autres, parmi ceux précédemment présentés. Les types cellulaires majeurs sont présentés : les cellules suppressives dérivées de la myéloïde (MDSC), les cellules présentatrices d'antigène (APC) et enfin les cellules souches (SC).

2.2.1 Les MDSC : gardes du corps des cellules cancéreuses

Étudié depuis plus de 20 ans, le rôle des MDSC dans le développement et la protection contre le système immunitaire du cancer est de mieux en mieux défini. Les MDSC permettent, dans un premier temps, à la tumeur de proliférer rapidement (Murdoch, Muthana, Coffelt, & Lewis, 2008) mais elles jouent également un rôle dans la suppression de la réponse immunitaire aux environs de la tumeur (Gabrilovich & Nagaraj, 2009).

Au sein de la moelle osseuse est produite une population cellulaire spécifique : les cellules myéloïdes immatures (IMC). En temps normal, ces cellules se différencient rapidement en granulocytes, macrophages ou cellules dendritiques matures. Cependant, lors d'un cancer, ce rapide changement de fonction est altéré, conduisant à une différenciation incomplète des cellules myéloïdes immatures et une accumulation d'un mélange de cellules non complètement différenciées dans la moelle osseuse (Youn, Nagaraj, Collazo, & Gabrilovich, 2008). Ce groupement de cellules IMC non complètement différenciées est ce qu'on appelle les cellules suppressives dérivées de la myéloïde (MDSC). Ces cellules seront par la suite recrutées par les cellules cancéreuses en deux étapes, une première conduisant à la prolifération des MDSC et une deuxième permettant de les activer. De nombreux facteurs sont impliqués dans la prolifération des MDSC et sont répertoriés dans la revue de littérature de Dmitry I. Gabrilovich et Srinivas Nagaraj (Gabrilovich & Nagaraj, 2009). Brièvement, il apparaît que certains facteurs sécrétés par

les tumeurs vont favoriser la phosphorylation de la molécule *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3), ce qui va conduire à une augmentation de la myélopoïèse et une diminution de la différenciation en cellules myéloïdes matures. Plus récemment, des études tendent à montrer que la molécule STAT3 joue également un rôle dans la migration des MDSCs vers les tumeurs via la surexpression des protéines S100 liant le calcium (S100A8 et S100A9) et pouvant être détectées par des récepteurs membranaires des MDSCs. Après expansion et migration, les MDSCs doivent être activées pour effectuer leur rôle immunosuppresseur. Cette activation se produit via l'intervention de facteurs pro-inflammatoires produits par les lymphocytes T actifs ou les cellules tumorales. On y retrouve les IFN- γ , les interleukines 4 et 13 (IL-4 et IL-13) ou encore le *transforming growth factor- β* (TGF- β). Ces facteurs vont activer certaines voies métaboliques par l'intermédiaire des molécules STAT6, STAT1 et le facteur nucléaire- κ B (NF- κ B).

Les MDSC ont une action très forte contre le système immunitaire. Elles empêchent la prolifération des lymphocytes-T, inhibent la réponse cytotoxique des lymphocytes-T et des cellules NK et induisent une production de cytokines pour une réponse immunitaire de type TH2 de la part des cellules présentatrices d'antigènes (Shibata, Gonda, & Takenoshita, 2016) (Figure 2.5). Au niveau du réseau métabolique des MDSCs, plusieurs phénomènes se produisent conduisant à la création de cet environnement immunosuppresseur. Comme les MDSC viennent d'un groupement de cellules hétérogènes, on peut les différencier en deux sous-parties : Les MDSC monocytes (M-MDSCs) et les MDSC granulocytes (G-MDSCs) (Shibata et al., 2016), qui vont avoir une action immunosuppressive par des mécanismes différents. Les M-MDSCs vont réduire la réponse immunitaire en augmentant l'activité enzymatique de ARG1 et NOS, conduisant à une surconsommation de la L-arginase environnante et une production d'oxyde nitrique (NO) (Rodríguez & Ochoa, 2008). Les G-MDSCs vont, pour leur part, produire des espèces oxygénées réactives (ROS) jouant un rôle dans l'immunosuppression comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Kusmartsev, Nefedova, Yoder, & Gabrilovich, 2004). Le NO et l'anion super-oxyde pourront réagir ensemble pour former le peroxonitrique (ONOO⁻), un puissant oxydant. Ces espèces très réactives n'existeront qu'aux abords des MDSCs et constituent donc une défense de contact en nitrant les acides aminés des récepteurs membranaires des lymphocytes T, comme le TCR (Nagaraj & Gabrilovich, 2008). De plus, ces MDSCs vont orienter la signalétique de la réponse immunitaire via l'augmentation de l'activité enzymatique de

l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) et la production de cytokines anti-inflammatoires (Mao, Poschke, & Kiessling, 2014).

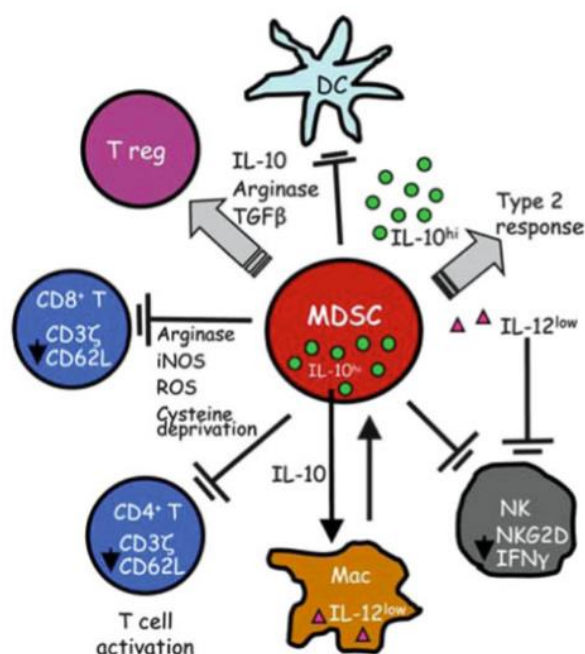


Figure 2.5: Influence des MDSC sur les cellules du système immunitaire

Tirée de Shibata et al. (Shibata et al., 2016)

2.2.2 Les cellules présentatrices d'antigènes

Il a été montré que les MDSC étaient des cellules immatures n'ayant pas réussi à se différencier complètement, résultant d'une sorte d'erreur de l'organisme. Cependant, le phénomène d'immunosuppression n'est pas seulement le fait d'un dysfonctionnement mais peut être mis en place par des cellules d'un individu sain de manière naturelle. Parmi ces cellules pouvant avoir, dans certain cas, un rôle naturellement immunosuppresseur, se trouvent les cellules présentatrices d'antigène (APC) en particulier les cellules dendritiques (DC) et les macrophages. Les APC jouent un rôle important dans la réponse immunitaire innée ou adaptative. Elles peuvent à la fois induire une réaction inflammatoire ou au contraire contribuer à une résistance contre cette réponse immunitaire.

Les APC, en particulier les macrophages, ont en effet une activité immunosuppressive lors de la grossesse comme le décrit la revue de Takeshi Nagamatsu et Danny J. Schust (Nagamatsu & Schust, 2010). L'embryon est considéré comme un élément extérieur de l'organisme par la mère,

sans l'intervention des macrophages, le système immunitaire de la mère aurait réagi comme lors de la détection d'antigènes et l'embryon aurait été éliminé. De nombreux macrophages sont présents aux abords du placenta lors de la grossesse et agissent sur le système immunitaire. L'étude des macrophages dans cette zone a permis d'élucider leurs mécanismes d'immunosuppression. Ainsi, les macrophages sont amenés à sécréter des cytokines anti-inflammatoires comme l'interleukine-10 (IL-10) (Heikkinen, Möttönen, Komi, Alanen, & Lassila, 2003) induisant une réduction de l'activité des lymphocyte T, mais aussi l'interleukine-15 (IL-15) avec une structure et des fonctions proches de celles de l'IL-2 qui agit sur les cellules tueuses (NK). Ces macrophages produisent également de la prostaglandine E2 (PGE2) et ont une activité enzymatique de IDO importante conduisant à une diminution du tryptophane environnant (Munn et al., 1999). Cette caractéristique des macrophages immunosuppresseurs est appelée phase M2 en parallèle de la réponse Th2 des lymphocytes-T « helpers ». L'autre phase des macrophages, dites M1, conduit à stimuler la réponse immunitaire lors de la détection de bactéries ou de virus.

Outre le cas de la grossesse, les macrophages peuvent avoir un effet immunosuppresseur lorsqu'ils sont recrutés par les tumeurs. On les nomme alors les macrophages associés à la tumeur ou TAM. Ces TAM ont un rôle très important dans le développement des cellules cancéreuses et sont présents en grande quantité dans les tumeurs (Lewis, Leek, Harris, & McGee, 1995). Le comportement de ces macrophages est bien décrit dans la revue de Elias Obeid et al. (Obeid, Nanda, Fu, & Olopade, 2013). Brièvement, les tumeurs modifient le réseau sanguin afin de maintenir l'apport en nutriments nécessaire à leur croissance. La zone tumorale est donc très vascularisée et pauvre en oxygène. Lors de leur circulation dans le système sanguin, les TAM vont être recrutés au niveau des tumeurs qui sécrètent des facteurs d'inhibition de la migration des macrophages (MIF). Les macrophages, dans un milieu hypoxique et sous l'influence des MIF vont arrêter leur circulation au niveau de la tumeur (Obeid et al., 2013). Par la suite, les TAM vont passer en phase M2 dans le but de réparer le tissu blessé par la tumeur. Cependant, ce passage en phase M2 va conduire les macrophages à avoir un comportement immunosuppresseur. Les TAM vont en effet sécréter des cytokines anti-inflammatoires comme IL-10, TGF β ou PGE2 pour induire une réponse immunitaire de type TH2. L'activité enzymatique de l'arginase (ARG1) sera également augmentée induisant un manque en L-arginine et une sur-présence de NO dans l'environnement local de la tumeur (Ostuni, Kratochvill, Murray, & Natoli, 2015).

2.2.3 Les cellules souches

Un autre type de cellules peut également acquérir des propriétés immunosuppressives : les cellules souches. Les cellules souches mésenchymateuses (MSC) sont caractérisées par plusieurs propriétés répertoriées par le *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy* (Dominici et al., 2006). Tout d'abord, les MSC sont des cellules adhérentes en condition de culture standard. Elles possèdent les marqueurs de surface CD105, CD73 et CD90 mais n'arborent pas les CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 α ou CD19 et HLA-DR. Enfin, elles doivent également être capables de se différencier en ostéoblastes, adipocytes et chondroblastes *in vitro*. Les MSC sont présentes dans différents tissus comme les tissus nerveux ou adipeux, la moelle osseuse, le fluide amniotique, le cordon ombilical ou encore le placenta. Contrairement aux cellules souches d'embryon (ES) et les cellules souches pluripotentes induites (iPS), les MSC ne posent pas de problème éthique, n'induisent pas la formation de tératomes et ne présentent pas de problème d'histocompatibilité (Ma et al., 2014). De plus, les MSC n'expriment pas le HLA-DR ou les marqueurs de surfaces CD40, CD40L, CD80 and CD86 nécessaires au déclenchement d'une réponse immunitaire. Ainsi leur faible immunogénicité leur permet de ne pas être reconnu comme pathogénique après transplantation (Majumdar et al., 2003).

Récemment, il a été montré que les cellules souches avaient l'habilité de devenir immunosuppressives dans un environnement inflammatoire. La combinaison de la cytokine pro-inflammatoire IFN- γ avec une des autres cytokines pro-inflammatoires TNF- α , IL-1 α ou IL-1 β dans l'environnement induit un comportement immunosuppresseur (Krampera et al., 2006; Ma et al., 2014; Ryan, Barry, Murphy, & Mahon, 2007). Les effets des MSC immunosuppressives sur les cellules du système immunitaire ont été grandement étudiés et sont répertoriés par Georg Siegel et al. (Siegel, Schäfer, & Dazzi, 2009). Brièvement, les MSC agissent sur les lymphocytes T, B et les cellules NK. Les MSC stoppent les lymphocytes-T en phase G0/G1 ce qui les empêchent de proliférer (Di Nicola et al., 2002; Meisel et al., 2004). L'expansion des lymphocytes-T régulateurs (Treg) est cependant favorisée par l'action des MSC. La prolifération des cellules NK préalablement activée par IL-2 ou IL-15 est également interrompue par les MSC. Leur production de IFN- γ également (Spaggiari et al., 2008). Des incertitudes persistent encore sur la capacité des MSC à inhiber l'activité cytotoxique des cellules NK. De manière similaire aux lymphocytes-T, la prolifération des lymphocytes-B est interrompue par les MSC qui stoppent

le cycle de division cellulaire. De plus, les MSC empêchent les lymphocytes-B de se différencier et de sécréter des anticorps (Asari et al., 2009). Il est aussi apparu que les MSC étaient capables d'empêcher la différenciation des cellules de la moelle osseuse en cellules dendritiques (DC) (Djouad et al., 2007). Ces comportements immunosuppresseurs se traduisent par différents mécanismes métaboliques, qui diffèrent selon les espèces. Chez la souris, les MSC immunosuppressives vont augmenter l'activité enzymatique de NOS conduisant à une surconsommation de L-arginine et la production d'oxyde nitrique (NO) extracellulaire (Ren et al., 2008). Chez les humains en revanche, c'est l'activité de l'IDO qui est augmentée, induisant une surconsommation du tryptophane et une production des dérivés de la Kynurenine extracellulaire. On retrouve cependant dans les deux espèces des mécanismes communs comme la production de PGE2 ou des cytokines anti-inflammatoires comme IL-10 ou IL-6 (Ma et al., 2014).

En exploitant ces propriétés cellulaires particulières, de nombreuses recherches ont été effectuées afin de mettre en place une stratégie de thérapie cellulaire. L'injection de MSC immunosuppressives pourraient en effet réduire la réponse immunitaire lors d'un rejet de greffe (GvHD) ou d'une maladie auto-immune. Des essais cliniques ont déjà été réalisés pour traiter le rejet de greffe (Katarina Le Blanc et al., 2004), avec cependant des résultats qui ne sont pas systématiquement positifs. Dans certains cas, la thérapie s'est révélée inefficace et dans d'autres, elle a empiré la situation du patient (Ma et al., 2014). Il semble en effet que la concentration en molécules pro-inflammatoires dans l'environnement doit être suffisamment élevée pour induire le comportement immunosuppresseur des MSC (Renner et al., 2009). Il semble donc délicat de parfaitement anticiper le comportement cellulaire après injection. De nombreux phénomènes peuvent altérer ce comportement cellulaire comme l'origine tissulaire des cellules, le donneur, le milieu de culture cellulaire *in vitro* ou les méthodes de conservation de ces cellules. La revue de Samantha F. H. de Witte et al. (de Witte, Franquesa, Baan, & Hoogduijn, 2015) s'intéresse à ces problématiques et cherche à améliorer les méthodes d'utilisation de cellules MSC immunosuppressives. Récemment, une source de MSC prometteuses a été découverte dans le cordon ombilical et plus particulièrement de la gelée de Wharton. Cette gelée contient en effet des cellules souches WJMSC qui ont des propriétés similaires des autres cellules souches mais qui ont l'avantage d'être extraites de manière non intrusive facilitant les problèmes d'éthique (Bishai, El Ansary, Shaheen, & Farid, 2013).

2.3 Les méthodes de modélisations du métabolisme

De nombreux types cellulaires semblent donc pouvoir acquérir des propriétés immunosuppressives se traduisant par des modifications au niveau du métabolisme cellulaire. Toutefois, même si, par exemple pour les cellules MSC, les mécanismes cellulaires et métaboliques sont connus et bien décrits dans la littérature, leur utilisation pour des thérapies cellulaires est encore limitée dû à un manque de connaissances sur le comportement cellulaire lors de leur prolifération obligée *in vitro*. Il devient ainsi impératif de joindre aux connaissances actuelles un nouveau regard permettant de mieux décrire le comportement de ces cellules. Une approche permettant d'obtenir une quantité importante de résultats prospectifs, rapidement et à peu de frais, est l'expérimentation *in silico* venant compléter l'expérimentation en laboratoire (Sidoli, Mantalaris, & Asprey, 2004). En effet, l'étude du comportement cellulaire par la modélisation des réseaux métaboliques cellulaires impliqués dans le phénomène de l'immunosuppression permettrait d'apporter d'autres informations sur le comportement cellulaire telles que les vitesses de réactions chimiques, les constantes cinétiques ou les rapports de concentration de certains métabolites ou de l'énergétique cellulaire. Or, l'étude du métabolisme peut se faire à plusieurs niveaux de description, ce dernier facteur étant déterminant tant face à l'objectif d'une telle étude qu'au niveau de précision recherchée dans les résultats escomptés (Ghorbaniaghdam et al., 2014). De nombreuses approches, de l'analyse de flux métaboliques (MFA), à l'analyse de la dynamique des flux métaboliques (dMFA) en passant par l'analyse de flux métaboliques balancés (FBA), ont été développées et ont évolué sous l'influence des nouvelles techniques de mesures des métabolites. Certaines de ces méthodes sont répertoriées dans la revue de Maciek R. Antoniewicz (Antoniewicz, 2015).

2.3.1 Modélisation des flux métaboliques en régime stationnaire

Le réseau métabolique est avant tout une succession de réactions chimiques catalysées par des enzymes et dont le moteur réactionnel est généralement lié à la croissance cellulaire. Ces réactions peuvent avoir lieu à la fois au sein de la cellule entre des métabolites intracellulaires, ou à l'interface entre la cellule et le milieu extérieur en produisant ou consommant des métabolites extracellulaires. Devant la complexité du nombre de réactions biochimiques et l'impossibilité d'obtenir l'information complète sur l'évolution des concentrations des métabolites présents, une première série d'approches a été développée. Ces méthodes considèrent la réaction enzymatique

comme un flux métabolique indépendant de la concentration en métabolite présent (i.e. taux constant). Ces flux peuvent à la fois représenter une réaction enzymatique unique ou au contraire une succession de réactions linéaires. Le réseau métabolique peut donc se décrire de la manière suivante (Figure 2.6), où M_i sont les métabolites intracellulaires, S_i et P_i des métabolites extracellulaires respectivement consommés ou produits par la cellule et F_i , les flux métaboliques.

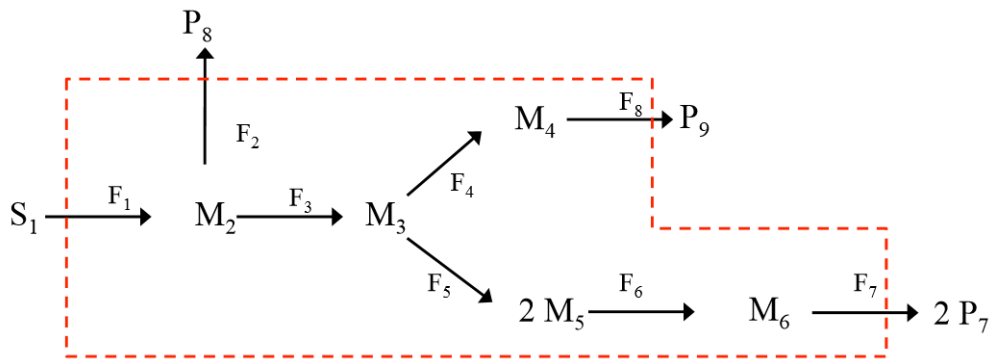


Figure 2.6: Représentation des flux d'un réseau métabolique

2.3.1.1 La MFA : analyse des flux métaboliques

L'approche MFA a tout d'abord été développée afin de déterminer l'ensemble des flux métaboliques à partir des connaissances sur les concentrations des métabolites extracellulaires uniquement. Le principe de cette modélisation repose uniquement sur la stœchiométrie du réseau de réactions. L'évolution de chaque métabolite est régulée par ces flux, pouvant le consommer ou le produire et par la dilution liée à la croissance cellulaire. La croissance cellulaire est quant à elle modélisée par un taux de croissance spécifique. On peut donc écrire les équations suivantes régissant la variation de concentration d'un métabolite et de la biomasse.

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (1)$$

$$\frac{dM_i}{dt} = S_i \cdot v - \mu \cdot M_i \quad (2)$$

$$\frac{dM_e}{dt} = R_i \cdot v = r_{exp} \quad (3)$$

Où X représente la biomasse, μ est le taux de croissance spécifique, M_i est l'ensemble des métabolites intracellulaires ou extracellulaires non mesurés, M_e est l'ensemble des métabolites

extracellulaires mesurés expérimentalement dans le temps, S et R sont les matrices de stœchiométrie du réseau correspondant aux métabolites M_i et M_e respectivement, r_{exp} est l'ensemble des flux mesurés (taux de variation des concentrations extracellulaires) et v est l'ensemble des flux métaboliques. Il suffit donc de trouver μ et v résolvant ces équations afin de décrire le comportement cellulaire.

Ces équations sont résolues grâce à deux hypothèses (Quek, Dietmair, Krömer, & Nielsen, 2010). La première considère que la cellule est en régime pseudo-stationnaire, la concentration de l'ensemble des métabolites intracellulaires est considérée constante dans le temps. Cette première hypothèse peut se justifier par le fait que les dynamiques intracellulaires sont beaucoup plus rapides que les extracellulaires et peuvent donc être négligés (Stephanopoulos, Aristidou, & Nielsen, 1998). La deuxième considère que le terme de dilution dû à la croissance est négligeable devant les flux car la variation des concentrations en métabolites intracellulaires est souvent très élevée par rapport au terme de dilution. L'équation précédente peut donc se simplifier en :

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (4)$$

$$S \cdot v = 0 \quad (5)$$

$$R \cdot v = r_{exp} \quad (6)$$

Le principe de la MFA revient donc à équilibrer les flux entre eux afin de décrire les taux de consommations et de productions des métabolites extracellulaires tout en maintenant les concentrations en métabolites intracellulaires constantes. La méthode de la MFA a été utilisée pour de nombreuses plateformes cellulaires comme *E. coli* (Edwards & Palsson, 2000), des cellules de plantes (Dersch, Beckers, & Wittmann, 2016) ou des cellules CHO (Ahn & Antoniewicz, 2011; Zamorano, Wouwer, & Bastin, 2010). Même si cela a permis d'avoir une meilleure compréhension du réseau métabolique (Boghigian, Seth, Kiss, & Pfeifer, 2010), la complexité du réseau, due aux cycles ou voies parallèles, empêche parfois la bonne résolution de système. Dans ces cas-là en effet, le système est sous-déterminé et il est nécessaire de pouvoir suivre l'évolution des métabolites internes ou d'imposer de nouvelles contraintes sur la résolution du système afin de réduire le champ des solutions. Cette approche présente donc des limites liées à la complexité des réseaux métaboliques étudiés.

2.3.1.2 La FBA et ^{13}C -MFA : l'amélioration de la MFA

Devant les difficultés de mesure des métabolites intracellulaires, une méthode utilisant le marquage isotopique au carbone 13 (C^{13}) a été développée (Gopalakrishnan & Maranas, 2015; Wiechert, 2001; Zhao et al., 2015) permettant d'obtenir plus d'informations pour la résolution du système : la ^{13}C -MFA. Le principe consiste à utiliser un substrat marqué au C^{13} comme le ^{13}C -glucose et de suivre le parcours de ces atomes de carbone marqués dans le réseau métabolique. La répartition du C^{13} dans le temps donnera des informations sur la répartition des flux intracellulaires. (He et al., 2014) Cependant, même avec cette technique, le nombre de solutions d'un système complexe est toujours important voire tendant vers l'infini en fonction du réseau étudié. De nouvelles hypothèses doivent être mises en place.

La FBA, analyse des flux balancés, vient se placer dans la continuité de la MFA. Lorsque le système à résoudre est sous-déterminé, la MFA ne propose pas de solution unique. La FBA met en place de nouvelles hypothèses permettant de restreindre l'espace des solutions et d'arriver si possible à une solution unique. Ces contraintes imposées à la résolution peuvent prendre différentes formes mais traduisent toutes un objectif biologique de la cellule. Par exemple, la cellule va maximiser sa croissance cellulaire ou alors augmenter son énergie via sa production d'ATP (Feist & Palsson, 2010). Il est également possible d'imposer des contraintes visant à maximiser la consommation d'un substrat précis ou la production d'une protéine d'intérêt, ou à ajouter des contraintes thermodynamiques (Kauffman, Prakash, & Edwards, 2003). La FBA a également été utilisée sur plusieurs plateformes cellulaires allant des microorganismes (Boghigian et al., 2010) aux cellules de mammifères avec une lignée d'hybridomes de souris réalisé par Sheikh et al. (Sheikh, Förster, & Nielsen, 2005).

2.3.1.3 Les autres méthodes d'analyses des flux

Contrairement à la MFA et à la FBA qui cherchent à trouver une solution unique d'un système plus ou moins complexe, il existe une autre méthode dites MPA : l'analyse des voies métaboliques. Le principe consiste à résoudre le système $S.v = 0$ avec pour seule autre hypothèse les contraintes thermodynamiques (Trinh, Wlaschin, & Srieenc, 2009). Il y a donc un ensemble infini de solutions et il faudra trouver un ensemble de solutions optimales.

La MFA et la FBA permettent d'analyser les flux métaboliques, de les connaître mais aussi d'orienter le métabolisme cellulaire en supprimant des voies régulées par des enzymes. Une fois

la voie ciblée, il suffit de supprimer une des enzymes clef de ce flux en jouant sur le génome de la cellule. Une méthode s'intéressant au rôle et à l'importance de chaque enzyme dans la mise en place d'un flux métabolique a été développé, la MCA : Analyse du contrôle métabolique. Cette méthode caractérise l'influence d'une enzyme sur le flux d'une voie métabolique par deux coefficients pour chaque enzyme. Ces deux coefficients sont calculés de la manière suivante (Fell, 1998) :

$$C_E^J = \frac{\partial J}{\partial E} \cdot \frac{E}{J} = \frac{\partial \ln(J)}{\partial \ln(E)} \quad (7)$$

$$C_E^Y = \frac{\partial Y}{\partial E} \cdot \frac{E}{Y} = \frac{\partial \ln(Y)}{\partial \ln(E)} \quad (8)$$

Où E est la concentration de l'enzyme, J est un flux de réaction, et Y la concentration d'un métabolite intermédiaire. C_E^J et C_E^Y mesurent respectivement la variation du flux et la variation de la concentration du métabolite quand on modifie la concentration de l'enzyme E. La méthode suppose alors que le système est en état de régime pseudo-stationnaire et dans ce cas, pour un flux J donné, la somme des coefficients de contrôle associés pour toutes les enzymes doit être égale à 1 alors que pour un métabolite intermédiaire Y, la somme des coefficients de contrôle associés pour toutes les enzymes doit être égale à 0.

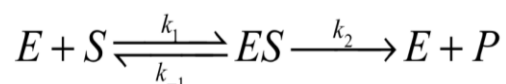
2.3.2 Modélisation dynamique

Les méthodes précédemment décrites permettent d'avoir une idée des flux métaboliques cellulaires en ne prenant en compte que l'évolution des concentrations des métabolites extracellulaires. Cependant, ces méthodes, pour obtenir une solution, posent toutes l'hypothèse d'un régime pseudo-stationnaire ne décrivant pas parfaitement le dynamisme cellulaire interne. En effet, les flux peuvent évoluer au cours d'une culture traduisant l'évolution du comportement cellulaire. Pour prendre en compte cette évolution temporelle, plusieurs méthodes ont été développées (Antoniewicz, 2013). Pour la plupart, le principe revient à effectuer une MFA temporelle. Brièvement, les flux de production et consommation des métabolites extracellulaires sont déterminés à différents intervalles de temps, puis, pour chaque temps étudié, une méthode de détermination des flux par MFA est effectuée. Il est donc possible d'obtenir une évolution des flux cellulaires de manière temporelle décrivant approximativement le dynamisme cellulaire.

Cette méthode est nommée l'analyse dynamiques des flux métaboliques, ou dMFA. Les phases temporelles étudiées peuvent être longues, décrivant deux comportements distincts comme la phase de croissance exponentielle et la phase de plateau chez les cellules CHO (Ahn & Antoniewicz, 2011; Gao, Gorenflo, Scharer, & Budman, 2007; Provost, Bastin, Agathos, & Schneider, 2006) ou au contraire être très rapprochées pour pouvoir faire *in fine* le lissage des données (Antoniewicz, 2013; Llaneras & Picó, 2007). Ces méthodes cependant ne font que décrire les flux de manière temporelle et ne prennent pas en compte l'évolution des concentrations des métabolites ainsi que leur influence sur les flux enzymatiques. Une méthode cependant, s'éloigne complètement de la MFA et se rapproche plus du modèle cinétique utilisé pour décrire une réaction chimique, en considérant que chaque flux est dépendant de la concentration du substrat qu'il consomme. Le flux qui était jusqu'alors la constante qu'il fallait déterminer va alors être une fonction de la concentration en métabolites ainsi que des multiples paramètres cinétiques et de régulation. Ces nouveaux paramètres auront l'avantage d'être indépendants du temps mais seront deux à trois fois plus nombreux que le nombre de flux. Cette méthode, dite d'analyse cinétique des flux métaboliques dynamiques (K-dMFA), à l'avantage de décrire l'évolution de la concentration des métabolites et leur influence sur les réactions enzymatiques. Le laboratoire où ont été effectués les travaux présentés dans ce mémoire de maîtrise a développé une telle approche de modélisation, principalement sur des cellules de mammifère (Ghorbaniaghdam et al., 2014; Ghorbaniaghdam et al., 2013; Robitaille et al., 2015).

2.3.2.1 La cinétique enzymatique

Pour décrire cinétiquement l'expression d'un flux, il est nécessaire de se rapprocher de l'aspect biochimique des réactions métaboliques dans la cellule. Dans le monde vivant, toutes les réactions chimiques sont réalisées par l'intermédiaire d'une enzyme jouant le rôle de catalyseur. Chaque enzyme possède un nombre fini de site(s) actif(s) pouvant accueillir un substrat. Dans une réaction enzymatique simple, le substrat S et l'enzyme E forment un complexe ES de manière réversible puis est transformé en produit P et en enzyme selon la réaction suivante :



Lorsque ce ou ces sites sont tous occupés par le substrat, la vitesse enzymatique est saturée à son maximum, à l'inverse si la quantité de substrat est trop faible, la vitesse réactionnelle est nulle. Le

flux de la réaction, ou la vitesse enzymatique V de cette réaction peut alors, selon la mécanique illustrée, être exprimée selon l'équation de Michaelis-Menten (Shuler & Kargi, 1992) sous la forme :

$$V = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad (9)$$

$$\text{avec } K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \text{ et } V_{max} = k_2 \cdot [E_0]$$

Cette équation prend pour acquis que la réaction directe de formation du complexe ES, sa réaction inverse correspondante, ainsi que la réaction de formation du produit sont toutes des réactions de premier ordre avec respectivement k_1 , k_{-1} et k_2 comme constantes cinétiques. La constante K_m est appelée la constante de demi-saturation, alors que $[E_0]$ correspond à la quantité d'enzyme initiale. Cette formulation a pour hypothèse que le complexe enzyme-substrat est constant et donc que la réaction globale est en régime permanent.

Dans certains cas, la liaison d'un substrat à un site actif de l'enzyme facilite la liaison subséquente d'autres substrats. Il est alors question de liaison allostérique. Ce type de liaison peut être modélisé par l'équation de Hill.

$$V = V_{max} \cdot \frac{[S]^n}{K_m^n + [S]^n} \quad (10)$$

Un coefficient n supérieur à 1 indique une coopération positive. Contrairement à la cinétique de saturation observée avec l'équation de Michaelis-Menten, l'équation de Hill prend une allure sigmoïdale lorsque l'on trace la vitesse réactionnelle en fonction de la concentration en substrat.

2.3.2.2 Activation et inhibition des voies métaboliques

Le taux de réaction enzymatique semble dépendre uniquement des concentrations en substrats et en enzyme. Cependant, d'autres métabolites peuvent venir influencer cette cinétique car le métabolisme cellulaire existe de par un haut niveau de régulation des voies. C'est le cas lorsqu'il y a des réactions d'inhibitions ou d'activations. Un métabolite peut en effet influencer l'enzyme afin de modifier le taux de réaction. Les cinétiques de ces mécanismes ont également été déterminées puis confirmées *in vivo*, et le Tableau 2.1 présente les équations associées aux types

d'inhibition (Shuler & Kargi, 1992) et d'activation (Segel) les plus courantes. Dans ces exemples, S représente un substrat, I un inhibiteur, A un activateur et K_i et K_a sont respectivement des constantes d'inhibition et d'activation.

Tableau 2.1: Équation des phénomènes d'inhibition et d'activation

Phénomènes	Équations
Inhibition compétitive	$V = \frac{V_{max}[S]}{[S] + K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad (11)$
Inhibition non compétitive	$V = \frac{V_{max}[S]}{([S] + K_m) \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad (12)$
Inhibition incompétitive	$V = \frac{V_{max}[S]}{[S] \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + K_m} \quad (13)$
Activation non essentielle	$V = \frac{V_{max}[S] \left(1 + \frac{\beta[A]}{\alpha K_a}\right)}{[S] \left(1 + \frac{[A]}{\alpha K_a}\right) + K_m \left(1 + \frac{[A]}{K_a}\right)} \quad (14)$

Une inhibition compétitive a lieu lorsqu'un métabolite est capable de se fixer à un site actif de l'enzyme à la place du substrat. Le substrat et l'inhibiteur sont alors en compétition. Lors d'une inhibition non compétitive, l'inhibiteur se lie à l'enzyme sur un autre site que le site actif, et entraîne une perte d'affinité de l'enzyme pour le substrat. Pour une inhibition incompétitive, l'inhibiteur agit sur le complexe enzyme-substrat et affecte la création du produit sans se lier à l'enzyme.

Lors d'une activation non essentielle, un activateur se fixe sur l'enzyme pour former un complexe enzyme-activateur améliorant la vitesse de la réaction enzymatique. Comme représenté à la Figure 2.7, la réaction se fait naturellement sans activateur mais avec une vitesse plus faible selon les valeurs des paramètres α et β .

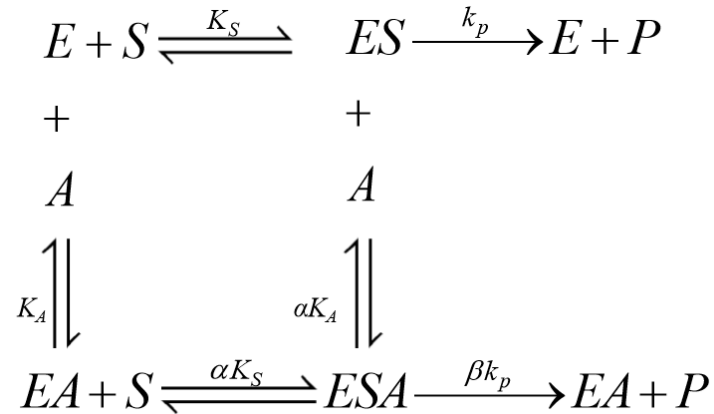


Figure 2.7: Mécanisme d'une activation non essentielle

Ce mécanisme, fait intervenir trois nouveaux paramètres : α , β et K_A . Selon les valeurs de α et β , la molécule A peut être un activateur, $\alpha < 1$ et $\beta > 1$, à la fois un inhibiteur ou activateur, $\alpha < 1$ et $\beta < 1$ selon la concentration du substrat [S], ou un inhibiteur non compétitif, $\alpha = 1$ et $\beta = 0$.

2.3.2.3 Modélisation de la croissance

Les flux métaboliques ont ainsi pu être transformés afin de prendre en compte l'aspect dynamique du comportement cellulaire. Il en est de même pour la croissance cellulaire qui ne peut dépendre d'une seule constante mais bien de la concentration en molécules disponibles pour la cellule. La croissance cellulaire ne peut se résumer à une simple réaction biochimique et est le fruit de nombreux processus complexes. Les équations pour la décrire ont donc été mises en place de manière empirique. L'équation la plus utilisée est celle de Monod qui propose que le taux de croissance spécifique d'une culture dépende de la concentration en un substrat limitant. Cette équation prend la même forme qu'une équation cinétique de Michaelis-Menten. Plusieurs équations permettant de modéliser le taux de croissance spécifique μ en fonction d'un substrat S ont été mises en place afin de décrire au mieux la croissance cellulaire, selon le cas spécifique en jeu (Shuler & Kargi, 1992).

Tableau 2.2: Équations du taux de croissance spécifique

Modèle	Équation	
Équation de Monod	$\frac{\mu_m S}{K_i + S}$	(15)
Équation de Tessier	$\mu_m(1 - e^{-KS})$	(16)
Équation de Moser	$\frac{\mu_m S^n}{K + S^n}$	(17)
Équation de Contois	$\frac{\mu_m S^n}{K \cdot X + S^n}$	(18)
Inhibition par le substrat (non compétitif)	$\frac{\mu_m S}{K_i + S \left(1 + \frac{S}{K_I}\right)}$	(19)
Inhibition par le substrat (compétitif)	$\frac{\mu_m S}{K_i \left(1 + \frac{S}{K_I}\right) + S}$	(20)

K_S est la constante de saturation de la vitesse de croissance et μ_m représente le taux de croissance spécifique maximal. Ces deux paramètres sont les corolaires respectifs des paramètres K_m et V_{max} de la cinétique enzymatique michaelienne. Cependant, dans la plupart des cas, de nombreux substrats sont nécessaires à la croissance et peuvent limiter la division cellulaire. Trois solutions ont donc été développées (Shuler & Kargi, 1992), soit en multipliant les cinétiques de Monod entre-elles (équation 21), soit en les additionnant (équation 22) ou encore en ne considérant que le substrat le plus limitant (équation 23). Ces dernières représentations peuvent se révéler utiles pour décrire la croissance à partir de métabolites intracellulaires lors du développement d'un modèle métabolique dynamique.

$$\mu = \mu_m \cdot \prod_i \frac{S_i}{K_{S_i} + S_i} \quad (21)$$

$$\mu = \mu_m \cdot \sum_{i=1}^N \frac{\frac{K_{S_i}}{S_i}}{\sum_{i=1}^N \frac{K_{S_i}}{S_i}} * \frac{S_i}{K_{S_i} + S_i} \quad (22)$$

$$\mu = \mu_m \cdot \frac{S_i}{K_{S_i} + S_i}, \text{ pour le } \frac{S_i}{K_{S_i} + S_i} \text{ le plus faible} \quad (23)$$

2.3.2.4 La K-DMFA : Analyse cinétique des flux métaboliques dynamiques

Il est donc possible de décrire les flux et la croissance cellulaire de manière dynamique grâce aux équations cinétiques. Cependant ce type de modèle contiendra nécessairement un nombre de paramètres cinétiques important à déterminer. Différentes méthodes ont été développées afin de déterminer la valeur de ces paramètres. De manière générale, toutes les études cherchent à trouver les paramètres permettant au modèle de décrire au mieux les données expérimentales et donc de minimiser la somme pondérée de l'écart au carré entre la moyenne des valeurs mesurées expérimentalement et la simulation, dite WSSRES, représenté par la formule ci-dessous.

$$\min \text{WSSRES} \left[\sum_{t=1}^k \sum_{m=1}^n \left(X_{t,m}^{\text{sim}} - X_{t,m}^{\text{mea}} \right)^2 \text{var}_m^{-1} \right].$$

Où $X_{t,m}^{\text{mea}}$ et $X_{t,m}^{\text{sim}}$ représentent respectivement les valeurs au temps t du métabolite m mesuré expérimentalement et simulé. var_m est la variance des données expérimentales pour le métabolites m . Les paramètres minimisant cette somme seront à même de décrire au mieux le système biologique.

De premiers essais ont été effectués avec des modèles mixtes, dits hybrides, entre modèles cinétiques K-DMFA et modèle dynamique classique DMFA (Yugi, Nakayama, Kinoshita, & Tomita, 2005). Dans ces modèles, les flux d'une partie du réseau sont décrits de manière cinétique en fonction des concentrations en métabolite tandis que le reste des flux est déterminé par MFA, donc sous l'hypothèse du régime pseudo-statique, mais à différents instants (i.e. temps de culture). Dans une majorité des cas, les flux cinétiques sont ceux en lien avec les métabolites extracellulaires et la croissance cellulaire, plus facile à déterminer expérimentalement, les « frontières » du réseau statique sont donc encerclées de flux cinétiques. Pour décrire le modèle,

il suffit donc de trouver les paramètres permettant de déterminer les flux cinétiques puis de résoudre des MFA successives en fonction du temps en connaissant initialement uniquement les flux cinétiques. Cette méthode a été appliquée par Leduc et al. (Leduc, Tikhomiroff, Cloutier, Perrier, & Jolicoeur, 2006) sur des cellules de plante. La MFA étant un simple problème d'algèbre linéaire à résoudre, la difficulté réside dans la détermination des paramètres cinétiques. Dans cette étude de Leduc et al, les paramètres ont été déterminés de manière à minimiser la WSSRES manuellement et à l'aide de la fonction Matlab `lsqcurvefit.m`. Un autre modèle proposé par Nolan et Lee (Nolan & Lee, 2011) en 2011 pour les cellules de mammifères CHO présente également un mélange de cinétiques et dynamique simple. Dans ce modèle, certains flux, principalement ceux en lien avec des métabolites extracellulaires, sont exprimés de manière cinétique tandis que les autres seront déterminés par différentes MFA successives. De même ici, les paramètres cinétiques devaient être déterminés grâce aux outils d'optimisation de Matlab, mais devant le nombre de paramètres, le programme ne semblait pas converger. Nolan et Lee ont dû ajuster à la main les valeurs initiales des paramètres afin de se rapprocher des valeurs d'optimisation pour que le programme fonctionne.

Mis à part ces modèles dits "hybrides", des modèles complètement cinétiques ont également été développés sur la plupart des organismes majoritairement étudiés. C'est le cas pour *Saccharomyces cerevisiae* développé en 1997 par Rizzi et al. (Rizzi et al., 1997). Dans cette étude l'ensemble des flux sont décrits de manière cinétique en fonction des concentrations en métabolites. Les paramètres ont été déterminés grâce à une méthode innovante. Les concentrations mesurées expérimentalement au cours du temps ont tout d'abord été traduites mathématiquement par des fonctions dépendant du temps sans aucun sens biologique. Puis, étapes par étapes, les concentrations ont été exprimées par leurs fonctions cinétiques. Cette astuce mathématique, permettait de réduire le réseau à une seule réaction, de déterminer les paramètres cinétiques la concernant, puis d'agrandir le réseau. À chaque étape, les paramètres cinétiques des nouvelles réactions étaient déterminés. À la fin, une analyse de la sensibilité des paramètres sur le modèle a été effectuée afin de confirmer les valeurs obtenues. Cette méthode d'estimation des paramètres pas-à-pas a été reprise par Chassagnole et al. (Chassagnole, Noisommit-Rizzi, Schmid, Mauch, & Reuss, 2002) en 2012 pour *Escherichia coli*. Dans cette étude, lors de l'application de la méthode pas-à-pas, les paramètres ont été déterminés grâce à l'utilisation des logiciels ACSL (*integration procedure:Gear algorithm; Mitchell and Gauthier, Concord, MA*) et

OPTDESX (*optimization strategy: simulated an-nealing, Design Synthesis, Inc., Orem, UT*). Cette méthode de détermination des paramètres pas-à-pas semble donc permettre la mise en place d'un réseau cinétique complexe tout en limitant les interventions manuelles reposant sur le principe d'essai-erreur.

D'autres modèles complètement cinétiques ont été développés pour les cellules de plante par Valancin et al. en 2013 (Valancin, Srinivasan, Rivoal, & Jolicœur, 2013) ou par Cloutier et al. (Cloutier, Perrier, & Jolicœur, 2007) en prenant la suite du travail de Leduc et al. (Leduc et al., 2006) qui avait développé un modèle hybride. De même, des modèles complètement cinétiques ont été développés pour les cellules de mammifères CHO cultivées en mode cuvée simple (Ghorbaniaghdam et al., 2013) ou cuvée alimentée (Robitaille et al., 2015). Dans tous ces cas, les paramètres ont été déterminés en minimisant la WSSRES par des méthodes mixtes entre modifications manuelles des paramètres et optimisation via des fonctions Matlab lorsqu'il y avait convergence.

Plus récemment, une nouvelle méthode de modélisation dynamique a été testée par Hagrot et al. (Hagrot, Oddsdóttir, Hosta, Jacobsen, & Chotteau, 2016). Cette méthode consiste à la mise en place d'un modèle complètement cinétique mais en prenant en compte les flux des modes élémentaires (EFM) au lieu des flux de chaque réaction enzymatique. Cette méthode présente l'avantage d'avoir beaucoup moins de paramètres à déterminer, mais ne permet de caractériser la cellule que d'un point de vue macroscopique, sans aucune prédiction des mécanismes intracellulaires.

2.3.3 La modélisation comme outil de caractérisation du comportement cellulaire

Après avoir franchi l'étape de détermination des paramètres cinétiques, il semble donc possible de modéliser de manière dynamique l'ensemble d'un réseau métabolique via des équations cinétiques, et ainsi accéder à un niveau élevé de description du métabolisme cellulaire. Développés sur de nombreuses plateformes cellulaires, les modèles cinétiques sont d'une grande utilité pour la compréhension et l'élucidation des mécanismes du fonctionnement cellulaires. Les modèles cinétiques peuvent être utilisés tout d'abord de manière prédictive. Ils peuvent, entre autre, montrer l'influence d'une modification enzymatique sur l'ensemble du réseau. En effet, les

paramètres cinétiques sont liés à l'activité enzymatique. Les valeurs maximales des flux (v_{max}) sont reliées à la concentration enzymatique active tandis que les constantes de Michaelis-Menten (K_m) sont reliées à la disponibilité et l'affinité des sites actifs de l'enzyme pour le substrat. Comme effectué par Shlomi et al. (Shlomi, Cabili, & Ruppin, 2009), il est possible de simuler une enzyme non fonctionnelle et d'en prédire les effets grâce à la modélisation, en diminuant la valeur du flux maximal (v_{max}) correspondant à l'enzyme jusqu'à 10% de sa valeur initiale. Il est également possible de prédire l'influence de la composition en métabolites du milieu de culture sur le comportement cellulaire. En effet, le modèle repose sur des valeurs initiales des concentrations de métabolites établies. Un changement des valeurs initiales de ces concentrations aura donc des conséquences sur la simulation du modèle, qui dépend en partie des conditions initiales. C'est le cas du modèle réalisé par Robitaille et al. (Robitaille et al., 2015), qui permet de simuler le métabolisme des cellules CHO dans différents environnements de culture en cuvée simple ou cuvée alimentée. Il sera ainsi possible de changer les variables numériques traduisant l'environnement de la cellule pour anticiper son comportement sans avoir à effectuer d'expériences longues et coûteuses.

En plus de pouvoir prédire le comportement cellulaire, les modèles cinétiques peuvent mettre en évidence l'impact d'un comportement cellulaire ou d'un facteur extérieur sur le métabolisme. Pour évaluer cet impact, il suffira de réaliser deux variantes d'un modèle métabolique et d'identifier les paramètres cinétiques affectés par les différentes conditions expérimentales. Ces paramètres cinétiques étant directement liés aux activités enzymatiques, il sera possible d'évaluer l'impact de ces conditions de culture sur ces enzymes. Dans Ghorbaniaghdam et al. (Ghorbaniaghdam et al., 2013), l'influence du Na-butyrate a été étudiée sur les cellules de mammifères CHO. Pour cela, cette approche de comparaison de deux modèles cinétiques a été effectuée et a mis en évidence 4 paramètres cinétiques impactés. Les enzymes associées à ces paramètres ont donc pu être identifiées comme sensibles à l'action du Na-butyrate. Ces informations permettent donc de directement relier l'action d'un composant extracellulaire sur l'activité enzymatique, sans avoir à étudier le protéome des cellules. De même, il est possible d'identifier des changements dans le comportement cellulaire. En effet, les cellules peuvent acquérir plusieurs propriétés selon leur environnement. Comme précédemment, les conditions de culture vont avoir une influence sur la cellule ce qui va se traduire par une modification du métabolisme. La réalisation de deux modèles décrivant les cellules avec ou sans des propriétés

particulières permettront l'identification des paramètres affectés. Grâce à la mise en place de modèles cinétiques, ce ne sont plus uniquement les concentrations ou les taux de consommation ou production qui sont comparés, mais l'ensemble des paramètres cinétiques comme les v_{max} , les K_m mais aussi les flux ou différents ratios de paramètres. Les modèles cinétiques offrent donc la possibilité d'analyser rapidement l'ensemble des paramètres décrivant un comportement cellulaire et de fournir des données complémentaires non disponibles par la simple étude des résultats expérimentaux. La simulation du métabolisme a donc la capacité de prédire l'impact d'un changement dans les paramètres de culture et de mettre en valeur l'influence de ce changement sur le métabolisme des cellules. L'utilisation d'un tel modèle semble donc idéale pour la mise en évidence de biomarqueurs métaboliques reflétant un phénotype cellulaire d'intérêt.

En conclusion de ce premier chapitre, le phénomène d'immunosuppression est principalement modulé par différents métabolites agissant directement sur les cellules du système immunitaire. La concentration de ces métabolites est régulée par certaines cellules de l'organisme qui ont la capacité de devenir immunosuppressives. Dans cet ensemble de cellules, se trouvent les MSC pouvant être récupérées et cultivées pour être amplifiées facilement. Parmi ces MSC, on remarque les WJMSC venant du cordon ombilical, facilement extractibles, posant peu de problème d'histocompatibilité et d'éthique, et possédant les mêmes propriétés immunosuppressives que les MSC. Face à la gravité des maladies auto-immunes ou des rejets de greffe, l'idée de l'utilisation de ces cellules souches en thérapie cellulaire a été proposée récemment. Cependant, les premiers tests n'ont pas été concluants dû à la grande variabilité des MSC et à la compréhension incomplète de leur comportement. Il semble donc nécessaire d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes traduisant les propriétés immunosuppressives des MSC. Entre autres, il devient alors essentiel de pouvoir avoir à disposition des biomarqueurs efficaces à déterminer le potentiel immunosuppressif de cellules MSC en culture *in vitro* et destinées à une immunothérapie cellulaire. Pour cela, l'étude du métabolisme cellulaire semble tout indiquée car il traduit le moindre changement comportemental d'une cellule. L'un des meilleurs moyens d'effectuer une analyse complète du métabolisme et de définir des biomarqueurs efficaces et spécifiques, est la réalisation d'un modèle cinétique du réseau métabolique, permettant de mettre en évidence les caractéristiques directement liés à

l'immunosuppression et le métabolisme cellulaire modulant ces caractéristiques. C'est dans ce cadre que la modélisation cinétique du métabolisme des WJMSC a été proposée dans ce mémoire.

CHAPITRE 3 ARTICLE1: IDENTIFYING BIOMARKERS OF WHARTON'S JELLY MESENCHYMAL STEM CELLS USING A DYNAMIC METABOLIC MODEL: THE CELL PASSAGE EFFECT

Benoît Laflaquiere, Gabrielle Leclercq, Chandarong Choey, Jingkui Chen, Sabine Peres, Caryn Ito, Mario Jolicoeur *

Research Laboratory in Applied Metabolic Engineering, Department of Chemical Engineering, École Polytechnique de Montréal, C.P.6079, Centre-ville Station, Montreal (Quebec), Canada

*Corresponding author

Email: mario.jolicoeur@polymtl.ca (MJ)

3.1 Présentation de l'article

Cette section reprend l'article intitulé « *Identifying biomarkers of Wharton's jelly mesenchymal cells using a dynamic metabolic model : the cell passage effect* » qui a été soumis à la revue *Metabolites* dans l'édition spéciale *metabolomics modelling*. Cet article vise à mettre en évidence les changements métaboliques induits par les passages successifs en cours de culture des cellules souches mésenchymateuses de la gelée de Wharton, changements métaboliques également analysés à travers la modélisation cinétique. À partir de deux cultures cellulaires, l'une avec des cellules à un nombre de passages élevé et l'autre avec des cellules à faible nombre de passages, un modèle commun a été développé. Par l'identification de paramètres sensibles, deux modèles ont pu être affinés, permettant de décrire précisément chacune des cultures. Les résultats suggèrent des différences au niveau de la croissance cellulaire, de la demande et des moyens de production énergétique. De plus, certaines caractéristiques des cellules immunosuppressives sont présentes chez les cellules à passages faible, soulevant l'idée que les phénotypes immunosuppressif et du vieillissement cellulaire se chevauchent.

3.2 Abstract

For their unique ability to differentiate further into specialized cells, stem cells have been widely studied for developing various cell therapies. Methods to induce specific cell differentiations have been developed, but the control of the final cell phenotype remains uncertain. Although various biomarkers of stem cell phenotype evolution have been identified, the required assays are time consuming and do not allow, without cell culture assays in many cases, characterization of their specific traits or potential. For instance, the multipotent Wharton's Jelly mesenchymal stem/stromal cells (WJMSC) extracted from human umbilical cord is able to differentiate into osteoblasts, chondrocytes and adipocytes. However, WJ-MSCs also exhibit immunosuppressive traits under pro-inflammatory conditions, i.e. interferon- γ (IFN γ) and tumor necrosis factor- α (TNF α), and are immunoprivileged, but require a co-culture confirmation bioassay with T-cells to determine their immunomodulatory function. Indeed, these bioassays take days, which, in addition to the cell expansion required to obtain the desired relevant therapeutic cell numbers, may result in a phenotype loss along with the multiple cell passages. Therefore, the establishment of successful cell expansion protocols as well as robust cell therapies depend on fast and reliable characterization assays. To this end, we here explored WJMSC cell metabolome for the identification of biomarkers of the cell passage effect on the cells phenotype. We clearly show distinct metabolic behaviours comparing early (P4) and late (P9) WJMSCs, that differ slightly in immunosuppressive function, by analysing metabolomics data in synergy with an in-silico modelling platform. Of interest, early passage (P4) cells have a more bioenergy-saving metabolism compared to late passage (P9) cells that require a high amount of bioenergetic metabolites for cells maintenance. These differences lead to different origins for ATP production. Early passage cells may favour a glycolytic metabolism but are gradually switching to an oxidative phosphorylation metabolism while progressing with cell passages. These observations may be a result of a lower tolerance of oxidative stress for P9 cells compared to P4 cells. Moreover, even if P4 cells are not significantly immunosuppressive compared to P9 cells, we demonstrated that an earlier passage WJMSC could express some immunosuppressive biomarkers and that P4 cells are already too advanced to express clear phenotype, leading to an overlapping of immunosuppressive phenotype and senescent phenotype.

3.3 Introduction

Immunosuppressive cells play a crucial role in the regulation of human immune-system. A specific set of secreted cytokines are equilibrating the immune response, with either pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines. A dysfunction of this equilibrium can lead to various pathological disorders. On the one hand, the overexpression of pro-inflammatory cytokines has been identified as a main cause leading to Multiple Sclerosis (Steinman, 1996) and graft-versus-host disease (Ferrara et al., 2009). On the other hand, the overexpression of anti-inflammatory cytokines results in a deficient immune-system disabled to eliminate a pathogen or tumor cells (Serafini et al., 2006). Several cell types showed a capacity to impact on this cytokines equilibrium, by increasing or reducing their respective concentrations, as well as affecting the production or consumption rate of specific metabolites. For instance, macrophages exhibit specific behaviours when being either in M1 or in M2 phase (Italiani & Boraschi, 2015). In M2 phase, macrophages demonstrated an increased consumption rate of tryptophan, which leads to the starvation of the surrounding T-cells (Mellor & Munn, 1999; Munn et al., 1999). Also, recruited by tumor cells, myeloid derived suppressor cells (MDSC) are known to protect the tumor against the immune-system (Gabrilovich & Nagaraj, 2009). Once recruited, MDSCs increase their consumption of L-arginine (L-ARG) and their production of nitric-oxide (NO), both phenomenon resulting in reduced T-cells proliferation and viability (Bogdan, 2001; Bronte & Zanovello, 2005). Interestingly, MSCs placed within a pro-inflammatory environment appear to reduce the immune-response (K Le Blanc & Ringden, 2007). For instance, bone marrow mesenchymal stem/stromal cells (BMMSCs), induced by the pro-inflammatory cytokine interferon- γ (IFN γ), increase their uptake of tryptophan resulting in reduced T-cells responses (Meisel et al., 2004). More recently, Wharton's Jelly mesenchymal stem cells (WJMSC), extracted from human umbilical cord following a non-invasive procedure compared to bone marrow extraction (Chen et al., 2009), have revealed strong immunosuppressive properties under pro-inflammatory conditions with INF γ and tumor necrosis factor - α (TNF α) (Prasanna, Gopalakrishnan, Shankar, & Vasandan, 2010; Zhou et al., 2011). Moreover, MSCs do not express Human Leukocyte Antigen - antigen D Related (HLA-DR) or co-stimulatory clusters of differentiation 40 (CD40), CD40L, CD80 and CD86 cell surface antigens necessary to trigger an immune response (Katarina Le Blanc, Tammik, Rosendahl, Zetterberg, & Ringdén, 2003; Majumdar et al., 2003; William, Pendleton, Beyer, Egalka, & Guinan, 2003). Therefore, their low

immunogenicity evades immune recognition upon xeno or allogeneic transplantation. However, MSCs immunomodulatory function has been shown to decrease in prolonged *in vitro* culture, reaching undetectable levels at late passages (Phinney & Sensebé, 2013; Weiss et al., 2008). Indeed, unique MSCs immunomodulatory properties has led to nearly 200 clinical trials so far to test their efficacy at modulating severe immune and inflammatory responses associated to various medical pathologies (S. Wang, Qu, & Zhao, 2012). However, data emerging from these trials and preclinical studies are often inconsistent and contradictory (Galipeau, 2013; S. Wang et al., 2012). Besides pointing out inherent disparities between MSC donors and tissue source (Ho, Wagner, & Franke, 2009; Menard et al., 2013), most compelling cause of these varying results may be attributed to the *in vitro* bioprocessing of MSCs while expanding their numbers and characterizing their immunosuppressive capabilities.

MSCs are a heterogeneous population and the International Society for Cell Therapy recognizes the need for standardized metrics to assess MSC immunoregulatory function to enable clinical development (Krampera, Galipeau, Shi, Tarte, & Sensebe, 2013). The problem with current metrics is that they are too broad and only barely allow qualifying cell phenotype on time to help a clinician deciding to proceed with cell injection; a multiple day long cell culture assay being mandatory testing for T-cells or macrophages growth and viability reduction. However, “omics” approach clearly opens opportunities for fast and reliable assays allowing identifying efficient biomarkers of stem cell phenotype. Indeed, among the various omics approaches, metabolomics is gaining in interest since it allows an integrated and functional view on a cell population behaviour, with the genomic and the expressomics in action (Fiehn, 2002). Indeed, few metabolites have already been identified as being involved in cell immunosuppressive capacity (Bronte & Zanoello, 2005; Hammami, Chen, Bronte, DeCrescenzo, & Jolicoeur, 2012; Mellor & Munn, 1999), and an extended metabolic network characterisation could allow the identification of metabolic biomarkers of cell phenotype. We thus here present a study on the metabolic behaviour of Wharton’s Jelly mesenchymal stem cells (WJMSC), comparing early (P4) to late passage (P9) cells, with slightly different immunosuppressive function, under pro-inflammatory conditions. A dynamic metabolic flux analysis (dMFA) was performed to further characterize differences in the behaviour of both WJMSC cultures, using an *in silico* platform describing central carbon metabolism as well as pathways related to cell immunomodulatory mechanisms (Ghorbaniaghdam et al., 2013).

3.4 Materials and methods

3.4.1 Wharton's Jelly Mesenchymal stem cells culture

WJMSCs were first isolated from human umbilical cords at the Ottawa General Hospital, and transferred to the Ottawa Hospital Research Institute, where cells were placed in culture; P2 (Second passage) and P7 (seventh passage) cells were then transferred to Polytechnique Montreal on dry ice. Cells were thawed and cultivated in 75 cm² T-flasks and 150 cm² T-flasks (Life Science, Corning, Tewksbury) with 10 mL and 20 mL of α -MEM (Life Technologies, Burlington) supplemented with 20% of fetal bovine serum (Life Technologies, Burlington), 1% of Glutamax (Life Technologies, Burlington) and 1% of Antibiotic-Antimycotic (Life Technologies, Burlington), in a 5% CO₂, 5% O₂ and 37°C incubator. P4 and P9 cultures, respectively from P2 and P7 cells, were inoculated at a cell density of 5000 cells cm⁻² and every 48h, immunosuppressive properties of cells were maintained by adding 15 ng.mL⁻¹ of TNF α and 10 ng.mL⁻¹ of IFN γ in the culture medium. Before starting metabolites measurements, cells were first passaged, equivalent to P3 and P7 passage, during 60h, to avoid thawing disorders and to induced a proinflammatory environment with IFN γ and TNF α . For each analysis, cells were detached using 50 μ L/cm² of TrypLE (Life Technologies, Burlington), rinsed twice with PBS, centrifuged for 5 min at 300 x *g* and counted with a hemacytometer (Sigma-Aldrich). The protocol was the same for late and early cell cultures, however, the sample volume was adapted to the culture cell concentration. Because each sample has to contain at least 3x10⁶ cells for adequate metabolites quantification, P4 passage cells were sampled at 0, 12, 24, 32, 40, 48, 56, 64 and 72 h, whereas P9 passage cells were sampled at 0, 18, 27, 36, 45, 54, 63, 72 h in order to have enough cells for analysis.

3.4.2 Mixed Lymphocyte Reaction (MLR) Method

CD3⁺ T lymphocytes were isolated from umbilical cord blood samples (Canadian Blood Services) using a positive selection kit (StemCell Technologies, Vancouver, Canada) and stained with 1 μ M CFSE (Molecular Probes) for 5 minutes. Cells were washed twice with PBS (Corning), resuspended in OpTmizer media (Invitrogen) and 4 x 10⁴ cells per well were seeded in triplicate in a 96 wells plate (BD Falcon) and stimulated with CD3/28 Dynabeads (Invitrogen).

MSCs were grown as described above in proinflammatory conditions induced with TNF α and IFN γ , 48 h prior to harvesting. MSCs were resuspended in OpTimizer media and 4×10^3 cells were added to the stimulated T cells. Co-cultures were placed at 37°C in a humidified incubator, at 5% CO $_2$ and 5% O $_2$, for 5 days. To analyze T lymphocytes proliferation, cells were stained with anti-CD45 antibodies (clone 2D1) conjugated to AlexaFluor700 (eBioscience) and 10 ng μL^{-1} propidium iodide (Sigma) and analyzed using a BDFortessa flow cytometer. Stimulated CFSE fluorescence of CD3 $^+$ CD45 $^+$ cells, in the absence or presence of MSCs, were compared to determine T cell proliferation.

3.4.3 Intracellular metabolites extraction

The extraction protocol was adapted from Hammami et al. (Hammami, Chen, Murschel, et al., 2012) based on a method developed by Kimball et al. (Kimball & Rabinowitz, 2006). Briefly, for each sample, cells were extracted with 400 μL of 80% cold methanol in the presence of 0.2 g of sand (Sigma-Aldrich). After 30 min in dry ice, the mixture was vortexed at high velocity and then sonicated in ice and water for 5 min. Samples were then centrifuged for 7 min at 10,000 g and 4 °C to collect supernatants. The pellets were extracted a second and third time as described above with 200 μL of 50% cold methanol and 200 μL of ice-cold water, respectively. Supernatants were mixed and stored at -80 °C prior to analysis. Extracts were filtered through 0.2 μm PTFE filters (Millipore, Ontario, Canada) before analysis.

3.4.4 Nucleotides concentration

Nucleotides in WJMSCs extracts were analysed following the method developed in Hammami et al. (Hammami, Chen, Murschel, et al., 2012). Briefly, extracts were analyzed using a 1290 UPLC system coupled to a 6460 triple quadrupole mass spectrometer (both from Agilent Technologies, Quebec, Canada). Nucleotides were separated by Symmetry C18 column (150x2.1 mm, 3.5 μm) (Waters) and a Security C18 guard-column (Water, 10x2.1 mm, 3.5 μm) by the ion-pair method. DMHA (N,N-dimethylhexylanine, Sigma) was used as an ion-pair reagent to improve the signal-to-noise ratio with positive ionization mode. The mobile phase consisted of Buffer A: 10 mM ammonium acetate, 15 mM DMHA at pH 7.0, and buffer B: 40/60% (v/v) acetonitrile. Mobile phase flow rate was set at 0.3 mL/min with the following gradient: 0-10 min at 10% B, 10-20 min

at linear gradient from 10 to 30% B, 20-21 min at linear gradient from 30 to 60% B, 21-26 min at 60% B, 26-27 min with a linear gradient from 60 to 10% B and 27-35 min at 10% B.

3.4.5 Organic acids concentration

Organic acids concentrations were assessed using the above-mentioned UPLC-MS/MS system using a Hypercarb column (100x2.1 mm, 5 μ m) and a Hypercarb precolumn (2.1x10mm, 5 μ m) (Thermo Fisher, Ontario, Canada). The mobile phase consisted of Buffer A, 20 mM ammonium acetate at pH 7.5, and Buffer B, 10% (v/v) methanol in water. The flow rate was set at 0.3 mL/min with the following gradient: 0-5 min at 10% A, 5-10 min at linear gradient from 10% to 20% A, 10-20 min at linear gradient from 20% to 100% A, 20-30 min at 100% A, 30-32 min at linear gradient from 100% to 10% A and 32-40 min at 10% A. Quantification of metabolites (nucleotides and organic acids) was performed by integrating peak areas and using calibration curves. Cell specific concentrations in metabolites were calculated by normalizing the quantity of metabolites in cell extracts to the number of extracted cells.

3.4.6 Extracellular amino acids concentration

Extracellular samples were collected and diluted 1:10 in milli-Q water, then 1:10 with 50% methanol and finally 1:1 with amino acids ISTD. Samples were filtered through 0.2 μ m PTFE filters (Millipore, Ontario, Canada) before analysis.

The analysis of amino acids concentration was performed on an Agilent 1290 UPLC system (Agilent technologies, Montreal, Quebec, Canada) coupled to an Agilent 6460 triple quadrupole mass spectrometer (Agilent technologies, Montreal, Quebec, Canada), using previously described methods (Dell'mour et al., 2010; Preinerstorfer, Schiesel, Lämmerhofer, & Lindner, 2010). The underivatized amino acids were separated by a ZIC-Hilic column (3.5 mm, 200 Å, PEEK) (Merck SeQuant, Peterborough, Canada) and a ZIC-Hilic guard column (5 mm, 200 Å, PEEK) (Merck SeQuant, Peterborough, Canada) at a column temperature of 35°C and injection volume of 2 μ L. The mobile phase buffer contained 200 mM HCOONH_4 (Sigma, cat. # 74314) at pH 4. The mobile phase A contains 10% of the mobile phase buffer in water, and the mobile phase B contained 10% of the mobile phase buffer in acetonitrile (ACN) (Sigma, cat. # A3396). The mobile phase B was linearly decreased from 90% to 35% in 19 min, then was increased to 90% in one minute and held at 90% for 15 min at a flow rate of 0.1 mL min⁻¹. The Agilent 6460 triple

quadruple mass spectrometer (Agilent technologies), equipped with a Jet sheet stream electrospray ion source (Agilent technologies), was used for the analysis of amino acids in positive ion mode. The other parameters: gas temperature of 350°C, gas flow rate of 9 L min⁻¹, nebulizer pressure of 45 PSI, sheath gas temperature of 350°C, sheath gas flow rate of 10 L min⁻¹, capillary voltage of 3 kV. An internal standard solution containing 2 µM homoarginine (Fisher cat.# AC169090010), 2 µM homophenylalanine (Sigma cat.# 294357) and 2 µM methionine-d3 (CDN isotope D1292) was used as internal standard for quantification. The MRM transition and retention time of each amino acid is listed in Table 3.7 (Supplementary Materials). It should be noted that commercial standards of every medium compound and metabolite quantified were also used to establish calibration curves along with each series of analysis. Finally, extraction efficiency and compounds stability were determined using internal standards.

3.4.7 Extracellular nitric-oxide analysis

Nitric oxide (NO) concentration in supernatant was assessed using a Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit (Cedarlane, infos). The absorbance was measured at 540 nm with a Victor 3V multilabel reader (PerkinElmer, Waltham, United States).

3.4.8 Metabolic model structure

The global modelling approach previously validated for Chinese Hamster Ovary (CHO) cell lines (Robitaille et al., 2015) has been adapted to describe Wharton's Jelly stem cells. The metabolic network of reactions (Figure 3.1) composed of 49 enzymatic reactions (Table 3.3, Supplementary materials) includes the biochemical pathways of the central carbon metabolism as well as pathways specifically involved in the immunosuppression phenomenon. The model thus describes the glycolysis, the TCA cycle and the pentose phosphate pathway (PPP), as well as the energetic metabolism. The energetic metabolism includes the oxidative phosphorylation and other production and consumption mechanisms such as when energetic nucleotides are involved as co-factors as well as for fuelling anabolic reactions. Amino acids metabolism also considered: glutaminolysis with reactions involving aspartate and alanine transaminase (V_{ASTA} and V_{AlaTA}), serine conversion to pyruvate (V_{SDHH}), as well as amino acids conversion to alpha-ketoglutarate and succinate (respectively in $V_{AAtoSUC}$ and $V_{HISARGTA}$). The urea cycle is considered as well as the reaction involving indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) to account for well-known

immunosuppressive-related metabolic pathways. In total, 6 metabolic reactions were considered to describe the urea cycle: the inducible nitric oxide synthetase (NOS), arginase-1 (ARG1), arginase Transferase (ARGt), argininosuccinate lyase (ASL), argininosuccinate synthase (ASS) and ornithine carbamoyltransferase (OCT). This set of reactions was taken from Morris et al. (Morris Jr, 2002). The TCA cycle is described with reactions leading to citrate (CIT), alpha-ketoglutarate (AKG), succinyl-CoA (SCOA), succinate (SUC), fumarate (FUM), malic acid (MAL) and oxaloacetate (OXA). Moreover, metabolic pathways involving amino acids are detailed with reactions catalyzed by the enzymes asparaginase (ASN), asparagine transporter (ASNt), aspartate transporter (ASPt) as well as glutamine transporter (GLNt), glutamate transporter (GLUt), glycine transporter (GLYt) and glutaminase (GLNase). Moreover, the reaction involving creatine kinase (CK) is described. Finally, global lumped reactions for AMP synthesis from phosphoribosyl pyrophosphate (PPRibP) enzyme as well as NAD and NADP synthesis respectively from simplified pathways involving NAD(P)⁺ nucleosidase (NAT) and NAD-Kinase (NHG) are also described. Nucleotides synthesis is required since cell division implies dilution of their intracellular content. The specific growth rate kinetics and stoichiometry were taken from Robitaille et al. who described the CHO bio-system (Robitaille et al., 2015). Briefly, cell composition was taken from Sheik et al. (Sheikh et al., 2005) who developed a model for mammalian cells, and cell precursors of glycogen, lipids and nucleotides synthesis were assumed to be issued from glucose-6-phosphate (G6P), citrate (CIT) and ribulose-5-phosphate (R5P), respectively. The cell proteins were considered to have an average weight of 107.5 g.mol⁻¹ and the cell biomass a molar weight of 3.15 x 10⁻⁴ gDW.10⁻⁶ cells. Finally, enzymatic reactions were kinetically translated as described in the Appendix A leading to the set up of flux equations (Table 3.8, Supplementary Materials) as well as metabolite concentrations differential equations (Table 3.9, Supplementary Materials).

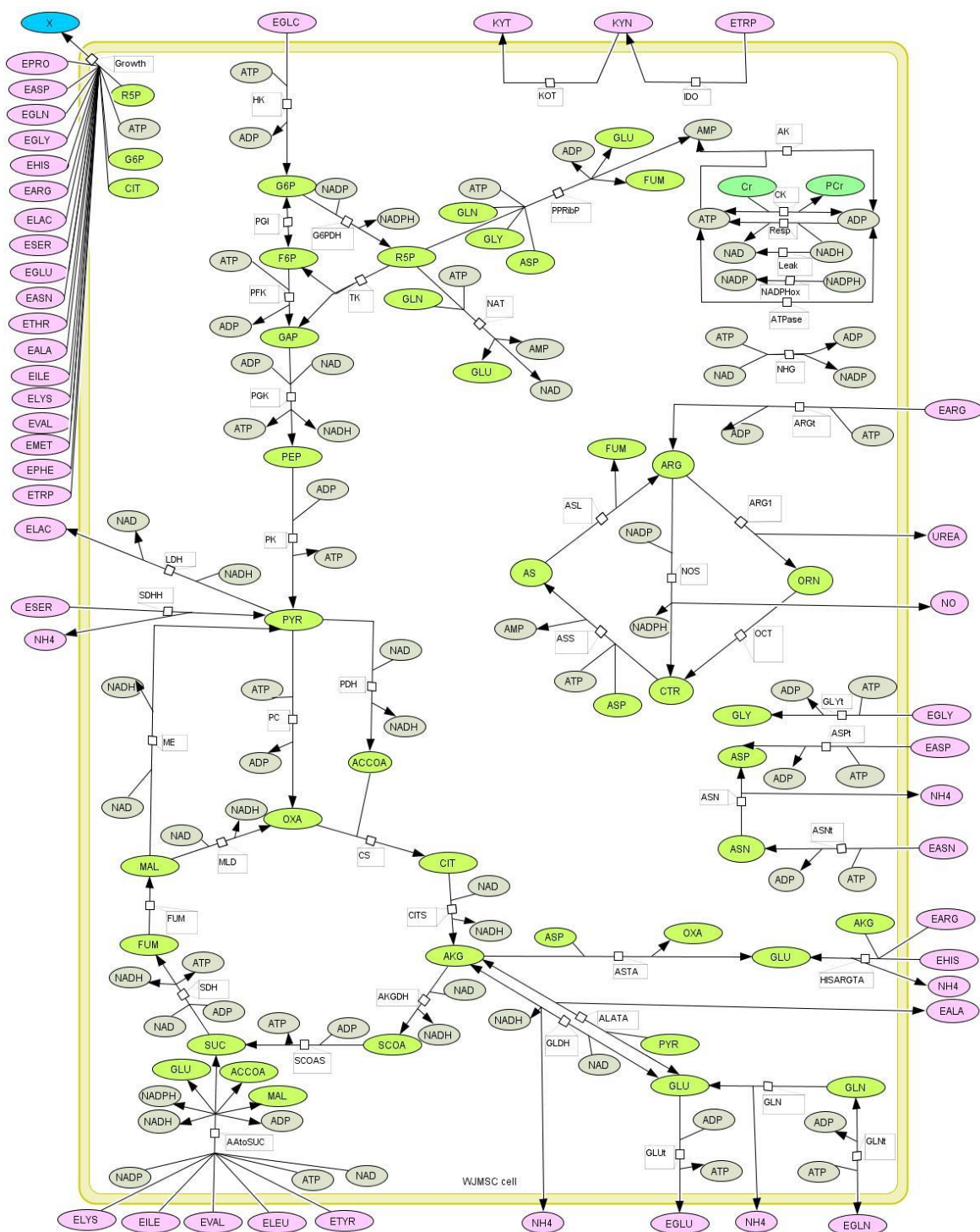


Figure 3.1: The metabolic network

3.5 RESULTS AND DISCUSSION

3.5.1 WJMSCs exhibit non-significantly different immunosuppressive phenotypes comparing P4 and P9 passage cells

A mixed lymphocyte reaction analysis (MLR) was performed, as proposed by Weiss et al. (Weiss et al., 2008) who compared the immunosuppressive phenotype of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUCMSC) at the 4th and the 9th passages. According to Weiss et al., hUCMSC cells immunosuppressive properties strongly decrease already from the early passages. In the present case, MLR analysis with WJMSCs shows no significant difference between early (4th or P4) and late (9th or P9) passage cells, although decreased immunomodulatory function is observed between the 4th and the 9th passages (Figure 3.2). This result can be explained by the fact that WJMSCs are a subset of hUCMSCs, which are composed of various types of MSCs found in the umbilical cord. Moreover, adding IFN γ and TNF α to the culture medium still showed a reducing trend of the cells immunosuppressive phenotype, an effect that was not, however, statistically significant.

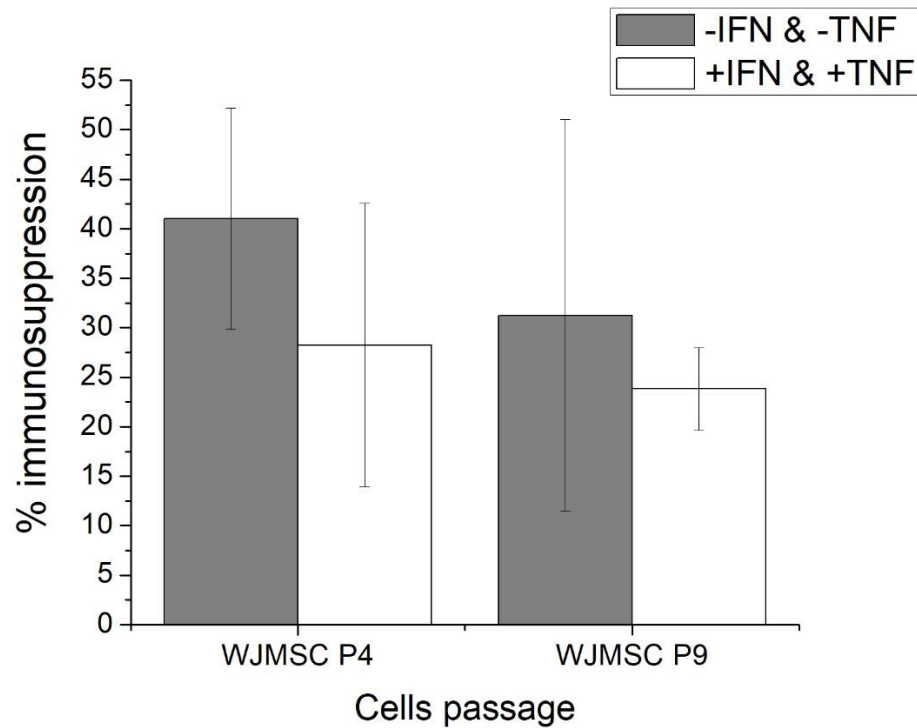


Figure 3.2: MLR data of WJMSC cells

Therefore, since both P4 and P9 cells present non-significantly different immunosuppressive capacity under pro-inflammatory conditions (i.e. +IFN & +TNF), a dynamic metabolomics study was performed analysing differences that can be mainly attributed to the influence of the passage number in *in vitro* culture.

3.5.2 WJMSC P4 and P9 passage cells show distinct metabolic behaviours

The metabolic model was first calibrated combining the two sets of experimental data for late and early passage cells, as described in the Appendix B, since there was no significant difference between P4 and P9 cells immunosuppressive capacity. The 234 parameters values (Table 3.6, Supplementary materials) were then determined. Then, a sensitivity analysis was performed assessing each parameter and the most sensitive ones were identified as described in the Appendix C. Among the 234 parameters, 31 are considered as highly sensitive, as they induce a variation of more than 10% of the global simulation error from a change of only 15% of their value (Figure 3.3). Most of these parameters are involved in the TCA cycle: such as the maximal reaction rate constants $vmax_{AAtoSUC}$, $vmax_{AKGDH}$, $vmax_{CITS}$, $vmax_{CS}$, $vmax_{PDH}$, $vmax_{SDH}$, $vmaxr_{ASTA}$ and the half-saturation constants $km_{AAtoSUC_{AKG}}$, $km_{AAtoSUC_{ILE}}$, $km_{AAtoSUC_{ELEU}}$, $km_{AAtoSUC_{ELYS}}$, $km_{AAtoSUC_{ETYP}}$, $km_{AAtoSUC_{EVAL}}$, $km_{CS_{ACCOA}}$, $km_{PDH_{PYR}}$ and $km_{SDH_{SUC}}$. Another sensitive group of model parameters is within the glycolysis pathway with especially the reaction catalysed by HK and LDH with $vmax_{HK}$, $vmax_{LDH}$, km_{HKEGLC} , $alpha_{HK_{AMP_{ATP}}}$, $km_{LDH_{PYR}}$, $beta_{HK_{AMP_{ATP}}}$, $alpha_{LDH_{AMP_{ATP}}}$ and $beta_{LDH_{AMP_{ATP}}}$. One parameter affects the glutaminolysis, $vmaxr_{GLN}$, one is involved in the urea cycle, $vmax_{OCT}$, and the others influence cell energetic state and growth rate with $vmax_{AK}$, $vmax_{growth}$, $vmax_{NADPHox}$, $vgrowth_{ATP}$ and $vgrowth_{ADP}$. This distribution of sensitive parameters may not be surprising because it highlights that vital metabolic pathways are sensitive to a cell behaviour. Indeed, we have identified a similar subset of sensitive parameters in previous studies with CHO cells with in particular $vmax_{growth}$, $vmax_{HK}$, $vmax_{LDH}$ and parameters involved in the TCA cycle (Ghorbaniaghdam et al., 2014; Ghorbaniaghdam et al., 2013; Robitaille et al., 2015). The lactate profile, depending on LDH, was also identified as sensitive in a study of Nolan et al. for another CHO cell line (Nolan & Lee, 2011). Interestingly, parameters of the intermediate reactions of glycolysis such as PGI, phosphoglycerate kinase (PGK) or PK are not sensitive in the WJMSC

model, although it was the case in previous studies on CHO cells (Ghorbaniaghdam et al., 2014; Ghorbaniaghdam et al., 2013; Robitaille et al., 2015).

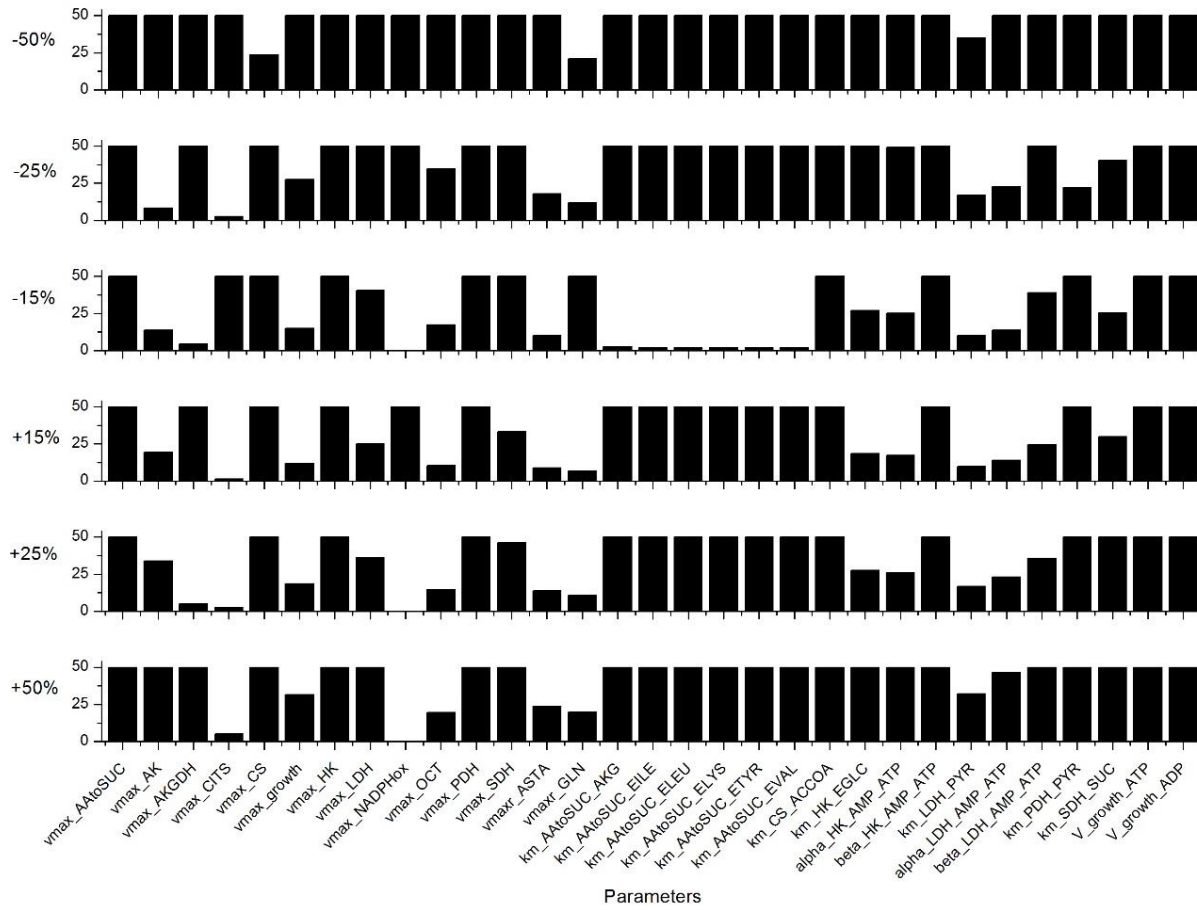


Figure 3.3: Sensibility analysis results for the 31 most sensitive parameters.

This selection is based on a simulation error criterion higher than 10% for a parameter value variation of $\pm 15\%$. Simulation error higher than 50% are truncated.

A first set of parameters were determined, anchoring the model on averaged WJMSCs behaviour, combining early and late passage cell data sets, while minimizing simulation error. Then, a parameter sensitivity analysis was performed identifying highly sensitive parameters, which are adjustable keys enabling model flexibility to distinctively describe P4 and P9 cell behaviours, although both presents a similar non-immunosuppressive phenotype. Therefore, the 31 sensitive parameters were thus further identified specifically for the P4 and the P9 cells, while keeping constant the other parameters with the exception of $vmax_{resp}$ (Table 3.1), which was also

modified. Indeed, even if $vmax_{resp}$ was not revealed as a sensitive parameter, it was further modified for its direct high impact on cell energetics (e.g. ATP-to-ADP ratio). It is also interesting to notice that for $vmax_{AK}$, $vmax_{r_{ASTA}}$, $vmax_{CITS}$, $vmax_{CS}$, $vmax_{LDH}$, $km_{LDH_{PYR}}$, $km_{AAtoSUC_{EILE}}$ and $alpha_{LDH_{AMP_{ATP}}}$, the percentage of difference of the parameters value is lower than 15% comparing both cell lines. However, the other 24 sensitive parameters needed being distinctively adjusted to describe P4 and P9 cells. Therefore, only 24 parameters value needed being modified to allow a 234 parameters model adapting to either early (P4) and late (P9) passage cells, while, interestingly, 7 other sensitive parameters did not require major modification. The analysis of the differences of model parameters value was then used, in the following sections, to further characterize changes in behaviour comparing early (P4) and late (P9) passage cells.

Table 3.1: Values of sensitive parameters according to cell passage.

Parameters	Units	P4 cells	P4 and P9 combined	P9 cells	P9 vs. P4
$vmax_{AAtoSUC}$	mmol. 10^{-6} cells.h ⁻¹	6.20E-04	6.20E-04	1.34E-02	22x
$vmax_{AK}$	mmol. 10^{-6} cells.h ⁻¹	1.87E-04	1.92E-04	1.94E-04	idem
$vmax_{AKGDH}$	mmol. 10^{-6} cells.h ⁻¹	1.53E-03	1.53E-03	1.53E-03	idem
$vmax_{CITS}$	mmol. 10^{-6} cells.h ⁻¹	9.42E-04	1.08E-03	1.11E-03	1.2x
$vmax_{CS}$	mmol. 10^{-6} cells.h ⁻¹	9.45E-04	1.08E-03	1.10E-03	1.2x
$vmax_{growth}$	h ⁻¹	8.57E-02	6.97E-02	4.26E-02	0.5x
$vmax_{HK}$	mmol. 10^{-6} cells.h ⁻¹	1.58E-03	1.00E-03	7.67E-04	0.5x
$vmax_{LDH}$	mmol. 10^{-6} cells.h ⁻¹	7.91E-05	8.80E-05	8.88E-05	idem
$vmax_{NADPHox}$	mmol. 10^{-6} cells.h ⁻¹	4.19E-05	5.33E-05	7.81E-05	1.9x
$vmax_{OCT}$	mmol. 10^{-6} cells.h ⁻¹	1.35E-04	1.42E-04	9.89E-05	0.7x
$vmax_{PDH}$	mmol. 10^{-6} cells.h ⁻¹	1.63E-03	1.17E-03	1.08E-03	0.7x
$vmax_{resp}$	mmol. 10^{-6} cells.h ⁻¹	7.09E-04	7.20E-04	1.20E-03	1.7x
$vmax_{SDH}$	mmol. 10^{-6} cells.h ⁻¹	1.39E-03	1.39E-03	1.39E-03	idem
$vmax_{ASTA}$	mmol. 10^{-6} cells.h ⁻¹	3.16E-04	3.16E-04	3.16E-04	idem
$vmax_{GLN}$	mmol. 10^{-6} cells.h ⁻¹	1.79E-01	1.79E-01	1.79E-01	idem
$km_{AAtoSUC_{AKG}}$	mM	1.83E-07	1.00E-07	5.21E-07	2.8x
$km_{AAtoSUC_{EILE}}$	mM	3.00E-01	3.00E-01	3.35E-01	idem
$km_{AAtoSUC_{ELEU}}$	mM	3.00E-01	3.00E-01	9.70E-01	3.2x
$km_{AAtoSUC_{ELYS}}$	mM	3.00E-01	3.00E-01	8.47E-01	2.8x
$km_{AAtoSUC_{ETYP}}$	mM	1.50E-01	1.50E-01	2.31E-01	1.5x
$km_{AAtoSUC_{EVAL}}$	mM	5.00E-01	5.00E-01	2.49E-01	0.5x
$km_{CS_{ACCOA}}$	mmol. 10^{-6} cells	1.00E-08	1.00E-08	1.00E-08	idem
km_{HKEGLC}	mM	4.95E+00	5.00E+00	6.06E+00	1.2x
$alpha_{HKEGLC_{ATP}}$	/	1.05E+00	1.10E+00	1.28E+00	1.2x
$beta_{HKEGLC_{ATP}}$	/	6.27E-01	1.05E+00	1.69E+00	2.7x
$km_{LDH_{PYR}}$	mmol. 10^{-6} cells	1.12E-07	1.08E-07	1.04E-07	idem
$alpha_{LDH_{PYR_{ATP}}}$	/	4.57E-01	4.65E-01	4.68E-01	idem
$beta_{LDH_{PYR_{ATP}}}$	/	1.38E+01	1.20E+01	1.19E+01	idem
$km_{PDH_{PYR}}$	mmol. 10^{-6} cells	4.06E-07	2.00E-07	2.00E-07	0.5x
$km_{SDH_{SUC}}$	mmol. 10^{-6} cells	3.00E-07	3.00E-07	3.00E-07	idem
$vgrowth_{ATP}$	mmol. 10^{-6} cells	1.19E-02	1.19E-02	1.19E-02	idem
$vgrowth_{ADP}$	mmol. 10^{-6} cells	1.19E-02	1.19E-02	1.19E-02	idem

3.5.3 P4 cells present a faster doubling time than late P9 passage cells

Cultivated under inflammatory conditions from 0 to 72 h, P4 WJMSC cells show a higher specific average growth rate of $2.36 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ (i.e. doubling time of 29.4 h) compared to $1.36 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ (i.e. doubling time of 51.0 h) for the late P9 passage cells (Figure 3.4). Indeed, this difference in their growth rate was reflected in the model maximum specific growth rate ($v_{max_{growth}}$) for simulating P4 cells, which was two times that required for P9 cells (Table 3.1). From a similar inoculation of $0.0375 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$, P4 cells reached $0.205 \pm 0.029 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$ at 72 h compared to $0.1 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$ for P9 cells. This result is in agreement with Kang et al. who observed a decreasing growth rate with increasing passage number in human mesenchymal stem cells from bone marrow and umbilical cord blood (Kang et al., 2004). Both cell cultures were stopped at 72 h, corresponding to the time P4 cells reached confluency.

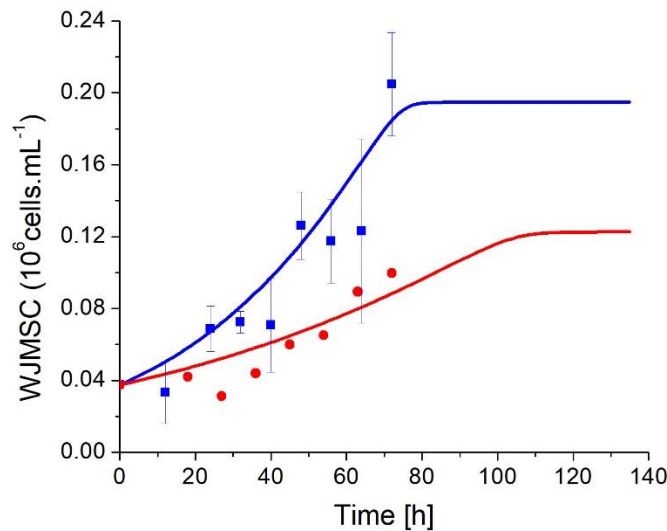


Figure 3.4: Effect of cell passage on cell growth.

■ are P4 cells experimental data, ● are P9 cells experimental. Data Average values are shown for early passage cells (n=3) and late passage (n=1). Blue line is P4 cells simulation, red line is P9 cells simulation.

However, model simulations, which cope with both P4 and P9 cell growth, allow further analysing differences between the two cultures. Indeed, since cell cultures were prematurely stopped because of reaching confluency in P4, model simulation of the cells specific growth rate behaviour with time was prolonged until reaching hypothetical growth cessation (Figure 3.5,3.6).

Model simulation of P4 cells growth showed an initial growth rate of $2.5 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ after inoculation, which is decreasing to $1.3 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ at 72 h for finally hypothetically (from model simulation) reaching growth cessation at 85 h. P9 growth rate starts from $1.2 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ and hypothetically (from model simulation) ceased at 110 h with a growth rate falling to $2.1 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$. Interestingly, the mean experimental specific growth rate between 0 and 72 h calculated by linear regression and that determined by the model are respectively similar for P4 and P9 cells (Table 3.2). The nutritional limitation phenomenon, which is normally expected to cause growth arrest, has been addressed, due to prolonged model simulations beyond cell culture duration, and the hypotheses are discussed in the following sections.

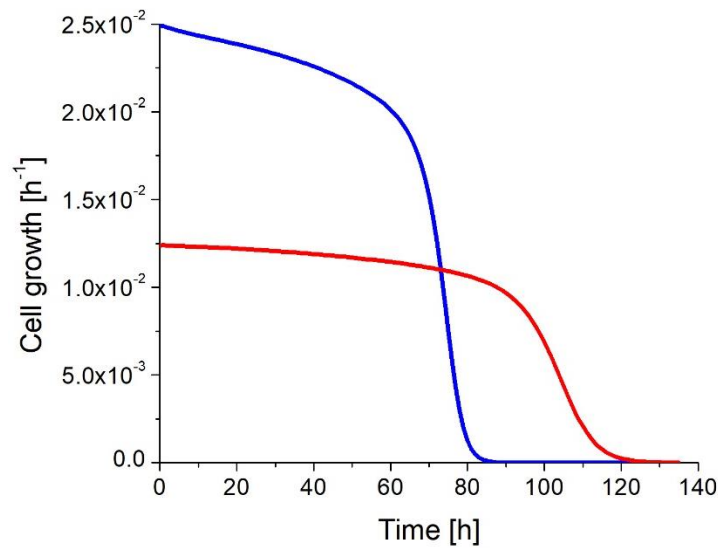


Figure 3.5: Model simulation of cells specific growth rate.

Blue line is P4 cell culture, red line is P9 cell culture.

Table 3.2: Experimental and model simulated specific growth rates

Cells	Experimental growth rate mean (h^{-1})	Growth rate mean from model (h^{-1})
P4	$2.4 \pm 0.3 \times 10^{-2}$	2.2×10^{-2}
P9	$1.5 \pm 0.3 \times 10^{-2}$	1.2×10^{-2}

3.5.4 P4 cells present a more active metabolism than P9 passage cells

3.5.4.1 Glycolysis pathway

Extracellular glucose (EGLC) uptake, extracellular lactate (ELAC) production, and intracellular pyruvate (PYR) and phosphoenolpyruvate (PEP) concentrations were measured with time whereas glucose-6-phosphate (G6P), fructose-6-phosphate (F6P) and glyceraldehyde-3-phosphate (GAP) concentrations were estimated along with model simulations (Figure 3.6). Before 54 h, glucose consumption and lactate secretion behaviours followed similar trends for both P4 and P9 cells, either calculated from experimental data and from model simulation. However, the cell passage effect starts being observable from 54 h, with EGLC and ELAC concentrations showing diverging trends comparing P4 to P9 cells. Indeed, from 54 to 72h, the average glucose uptake rate was of $3.4 \times 10^{-4} \text{ mmol} \cdot 10^{-6} \text{ cells} \cdot \text{h}^{-1}$ for P4 cells and $2.4 \times 10^{-4} \text{ mmol} \cdot 10^{-6} \text{ cells} \cdot \text{h}^{-1}$ for P9 cells whereas the average lactate consumption rate was of $5.8 \times 10^{-1} \text{ mmol} \cdot 10^{-6} \text{ cells} \cdot \text{h}^{-1}$ for P4 cells and $5.6 \times 10^{-1} \text{ mmol} \cdot 10^{-6} \text{ cells} \cdot \text{h}^{-1}$ according to experimental data. Looking at intracellular metabolic intermediates of glycolysis, PYR concentration shows staying constant and at a similar level of $2 \times 10^{-7} \text{ mmol} \cdot 10^{-6} \text{ cells}$ in P4 and P9 cell cultures (Figure 3.6-F), while PEP cell concentration remained at constant but distinct levels with $1 \times 10^{-7} \text{ mmol} \cdot 10^{-6} \text{ cells}$ in P4 cells and $4 \times 10^{-7} \text{ mmol} \cdot 10^{-6} \text{ cells}$ in P9 cells (Figure 3.6-E).

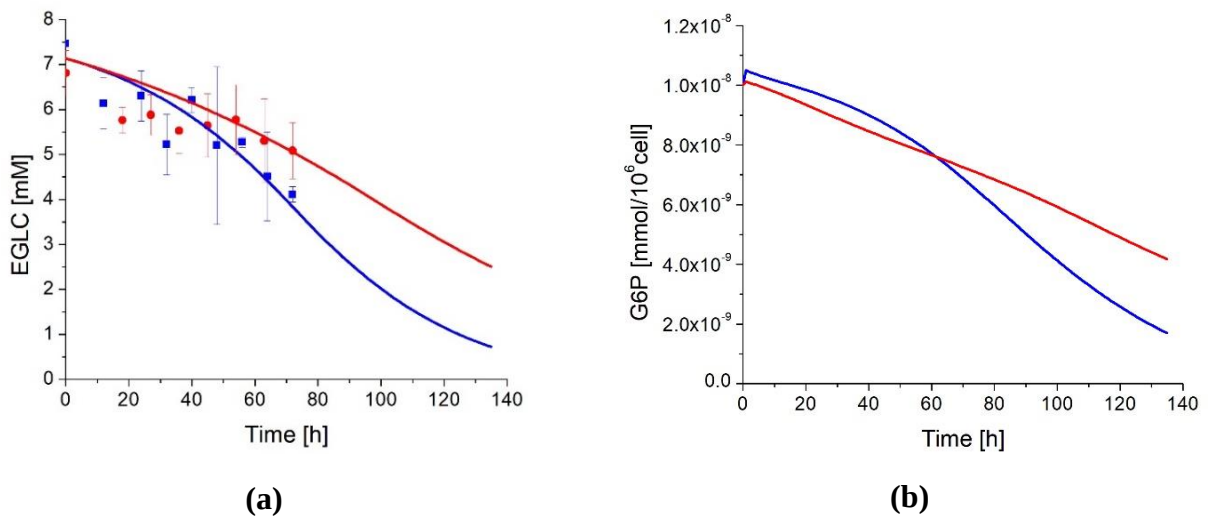
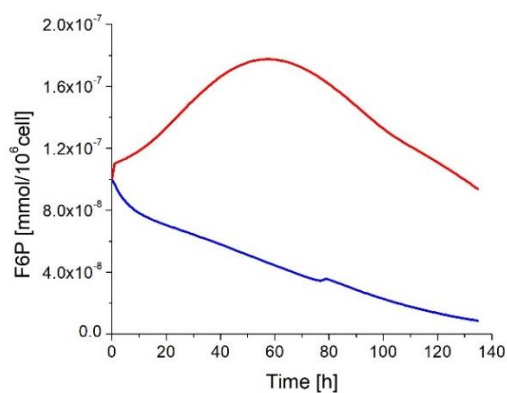
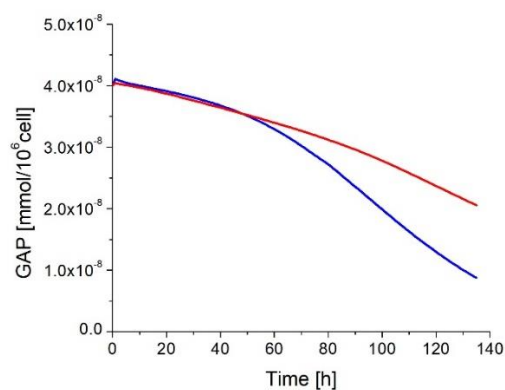


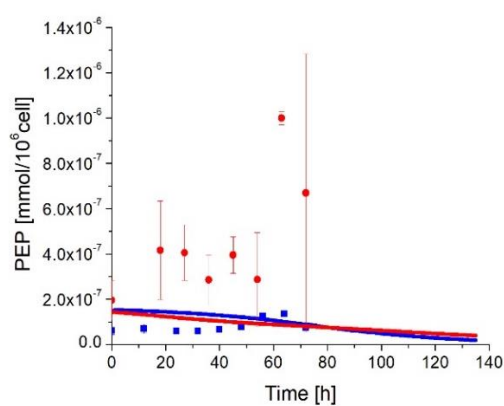
Figure 3.6: Effect of cell passage on glycolysis and pentose phosphate pathways intermediates concentration.



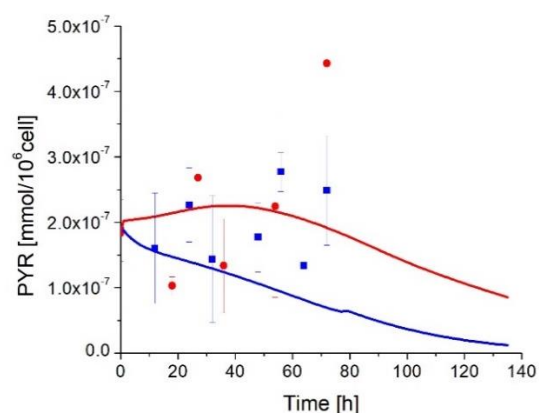
(c)



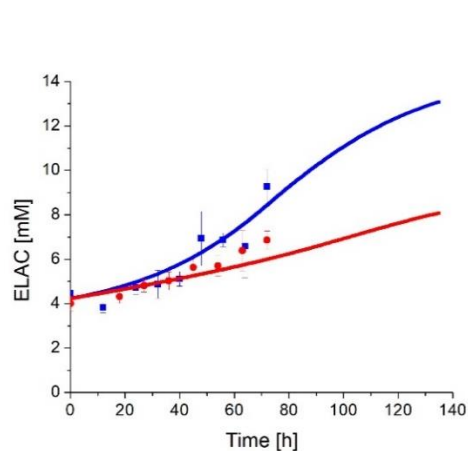
(d)



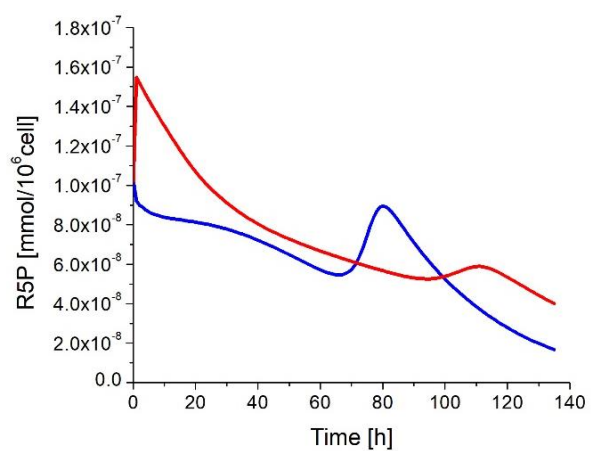
(e)



(f)



(g)



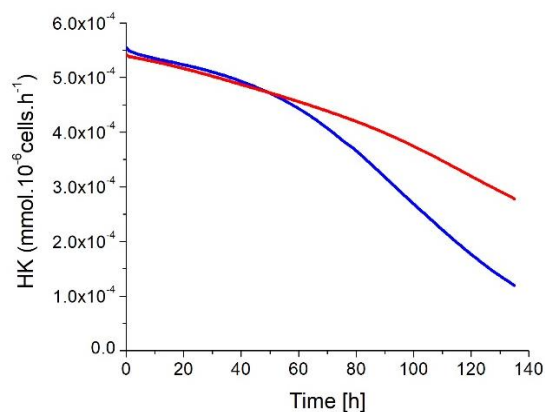
(h)

Figure 3.6: Effect of cell passage on glycolysis and pentose phosphate pathways intermediates concentration. (continue)

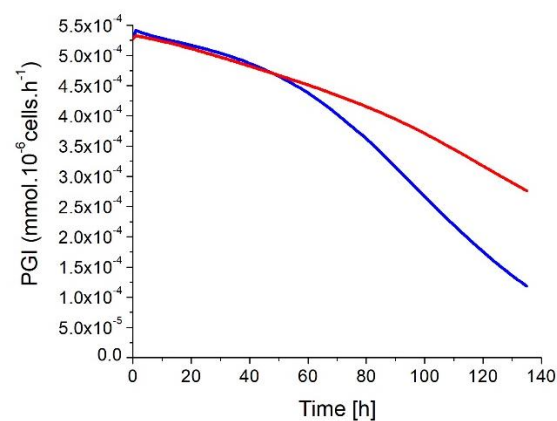
(a) Extracellular glucose concentration; (b) Glucose-6-phosphate concentration; (c) Fructose-6-phosphate concentration; (d) Glyceraldehyde-3-phosphate concentration; (e)

Phosphoenolpyruvate concentration; (f) Pyruvate concentration; (g) Extracellular lactate concentration; (h) Ribose-5-phosphate concentration. ■ are P4 cells experimental data, ● are P9 cells experimental. Data Average values are shown for both passages (n=3). Blue line is P4 cells simulation; red line is P9 cells simulation.

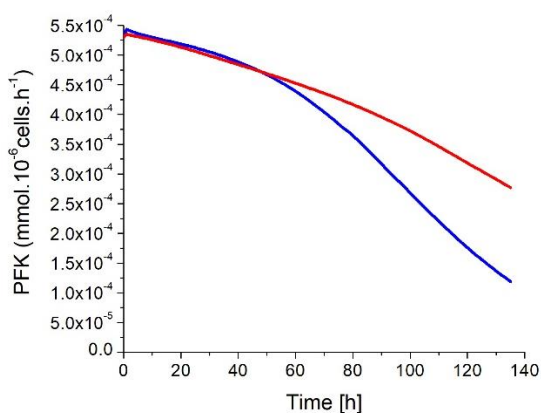
As mentioned above, a total of 8 sensitive model parameters are part of glycolysis (Table 3.1) and a subset required being modified simulating P4 and P9, such as $vmax_{HK}$ (x0.5), km_{HKEGLC} (x1.22), $alpha_{HKAMP_{ATP}}$ (x1.22), $beta_{HKAMP_{ATP}}$ (x1.22), $vmax_{LDH}$ (idem), km_{LDHPYR} (idem), $alpha_{LDHAMP_{ATP}}$ (idem) and $beta_{LDHAMP_{ATP}}$ (x0.86). Of interest, all these parameters are exclusively related to the entry (HK) and a major output (LDH) of the glycolysis pathway. Despite the 50% reduction of $vmax_{HK}$ in P9 cells (Table 3.1), the simulated fluxes of glycolysis are similar the first 54 h (Figure 3.7), from which a shift is observed in culture behaviour, clearly suggesting the primary role of cell energetic state which plays in flux regulation (Table 3.8, Supplementary materials). Globally, glycolysis shows similar concentration behaviour from EGLC to PYR in P4 and P9 cells before 54 h, while model simulates constantly decreasing fluxes (except for LDH which stayed stable at high level in P4 cells for decreasing concurrently to cell growth cessation). Except for LDH, all other glycolysis fluxes show diverging trends with a more pronounced decrease in P4 compared to P9 cells. P4 cells show a lower specific (i.e. normalized per 10^6 cells) glucose uptake rate than P9 cells after 54 h, but a higher specific lactate production rate during the whole culture. However, due to their higher specific cell growth rate, P4 cells culture lead to a higher final decrease of glucose concentration in the culture media. Thus, early passage P4 cells show a more active glycolytic metabolism during the high growth period (0-54 h) with a similar specific glucose uptake rate while a higher lactate specific production rate. P4 and P9 WJMSC cells present a glucose uptake rate and a lactate production rate before 54 h that are twice that reported for CHO cells. Indeed, CHO cells show a glucose uptake rate of $1-2 \times 10^{-4}$ mmol. 10^{-6} cells.h⁻¹ and a lactate production rate of $\sim 2 \times 10^{-4}$ mmol. 10^{-6} cells.h⁻¹ according to our previous work (Ghorbaniaghdam et al., 2013; Robitaille et al., 2015) or to other studies (Ahn & Antoniewicz, 2011; Nolan & Lee, 2011; Templeton, Dean, Reddy, & Young, 2013).



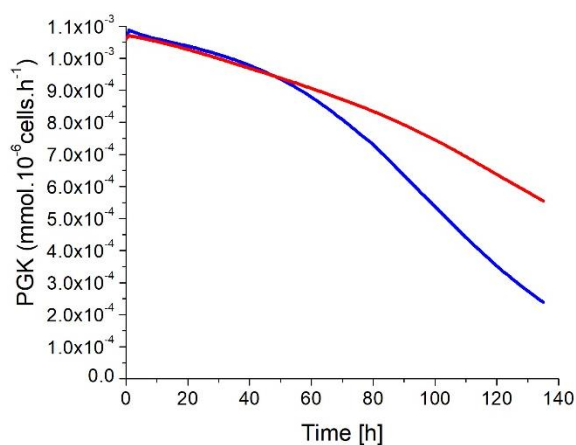
(a)



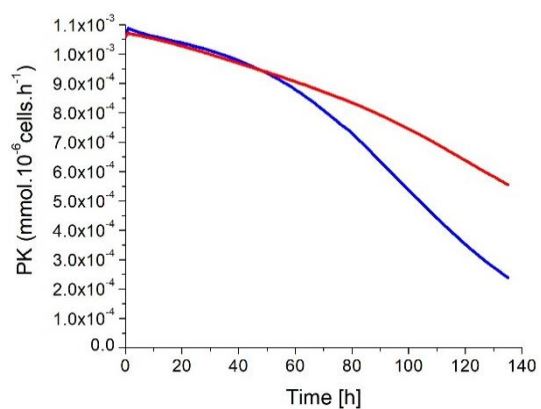
(b)



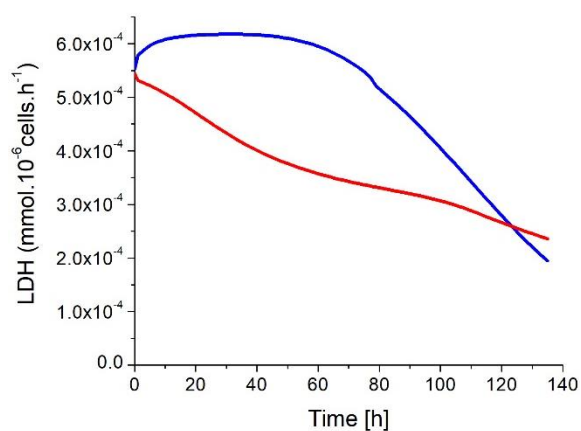
(c)



(d)



(e)



(f)

Figure 3.7: Glycolysis fluxes of WJMSC.

(a) Hexokinase flux; (b) Phosphoglucose isomerase flux; (c) phosphofructokinase flux; (d) Phosphoglycerate kinase flux; (e) Pyruvate kinase flux; (f) Lactate dehydrogenase flux. Blue line is P4 cell culture, red line is P9 cell culture.

Model simulations suggest that most of this glycolysis flux is used to synthesize pyruvate. Indeed, the flux feeding the pentose phosphate pathway (PPP) represents less than 1% of the total glycolysis flux (Figure 3.8). From pyruvate, the metabolic flux is distributed either to lactate or to the TCA cycle. Interestingly, P4 cells direct more than 50% of their glycolysis flux to lactate production during the whole culture, whereas P9 cells show opposite behaviour with more than 50% of the glycolysis flux feeding TCA cycle. These results highlight that P4 cells, with a similar specific EGLC consumption rate (HK) before 54 h, have a higher growth rate and manage to have enough bioenergy from mainly a glycolytic metabolism compared to P9 cells, which seem to count on oxidative phosphorylation metabolism. Of interest, our simulation results suggest late passage cells have a higher demand in energy. This possible switch from a glycolytic to a respiratory metabolism may represent a biomarker of the phenotype transition undergoing with cell passages. However, although literature clearly identified an aerobic glycolytic metabolism as a character of immunosuppressive cells (Hammami, Chen, Murschel, et al., 2012), further works with immunosuppressive WJMSCs are still required.

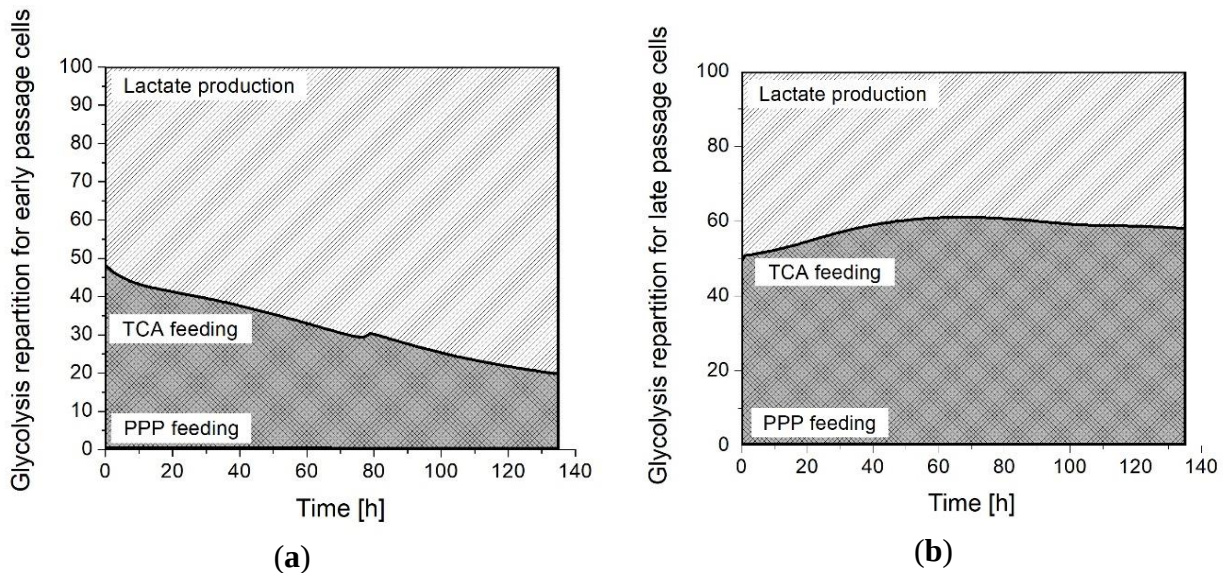


Figure 3.8: Glycolysis flux distribution.

(a) P4 cell culture; (b) P9 cell culture. ■ Lactate production, ■ TCA feeding, ■ PPP feeding.

3.5.4.2 The Pentose Phosphate Pathway is more solicited in P9 cells

The pentose phosphate pathways (PPP) is fed weakly, as mentioned above, by the glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) with a flux magnitude of $\sim 10^{-6}$ mmol. 10^{-6} cells.h⁻¹ from a glycolysis global flux of a magnitude of 10^{-4} mmol. 10^{-6} cells.h⁻¹ for both passage cells (Figure 3.9). Ribose-5-phosphate (R5P), the only PPP intermediate quantified, shows a similar decreasing trend for both passage cells (Figure 3.6). The transketolase (TK) enzyme shows a similar decreasing trend for both P4 and P9 cells and the reaction flux producing NAD from R5P (NAT) stayed constant for both conditions with, however, a higher value for P9 cells. Interestingly, phosphoribosyl pyrophosphate (PPRibP) activity is much higher in P9 cells with 2.5×10^{-7} mmol. 10^{-6} cells.h⁻¹ whereas it decreases in P4 cells from an initial value of 12×10^{-7} to 1.7×10^{-10} mmol. 10^{-6} cells.h⁻¹ at 80 h. The magnitude of the G6PDH flux in WJMSC with 10^{-6} mmol. 10^{-6} cells.h⁻¹ is similar to values reported in literature such as for CHO cells (Ahn & Antoniewicz, 2011; Robitaille et al., 2015).

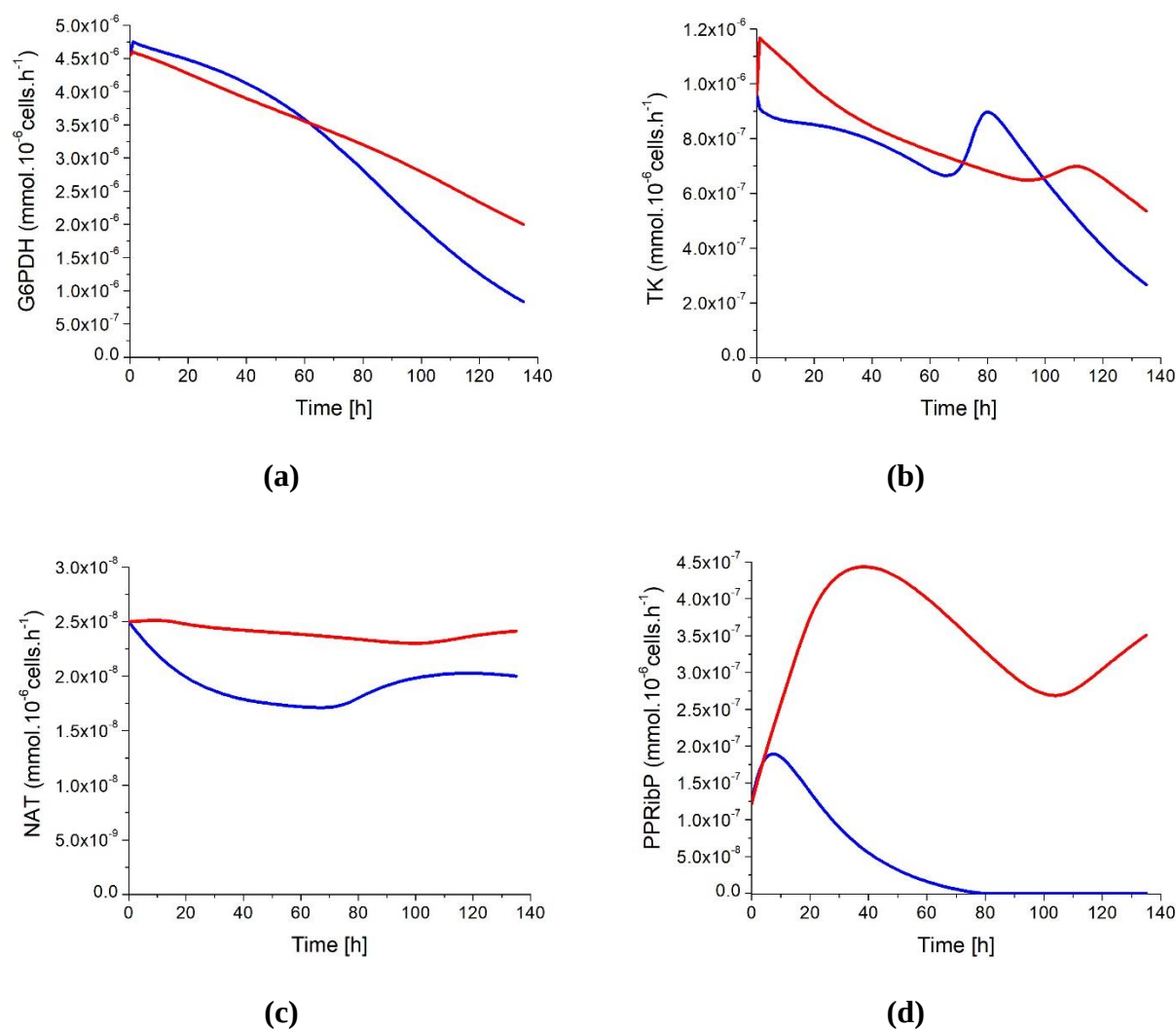


Figure 3.9: Fluxes of PPP.

(a) Glucose-6-phosphate dehydrogenase flux; (b) Transketolase flux; (c) NAT flux; (d) Phosphoribosyl pyrophosphate flux. Blue line is P4 cells simulation, red line is P9 cells simulation.

The distribution of PPP fluxes for cells synthesis, nucleotides synthesis and returning to glycolysis, has been drawn from model simulations (Figure 3.10). For both P4 and P9 cells, more than 50% of the incoming G6PDH flux returns to glycolysis. However, P4 cells have a higher need for the PPP flux for cell synthesis compared to P9 cells; a result agreeing with P4 higher specific cell growth rate. P4 cells require around 40% of the PPP flux before cell confluence

whereas P9 cells only require 20% of PPP. At the opposite, P4 cells only need 3 to 5% of the PPP flux for nucleotides synthesis whereas P9 cells require 5 to 10%.

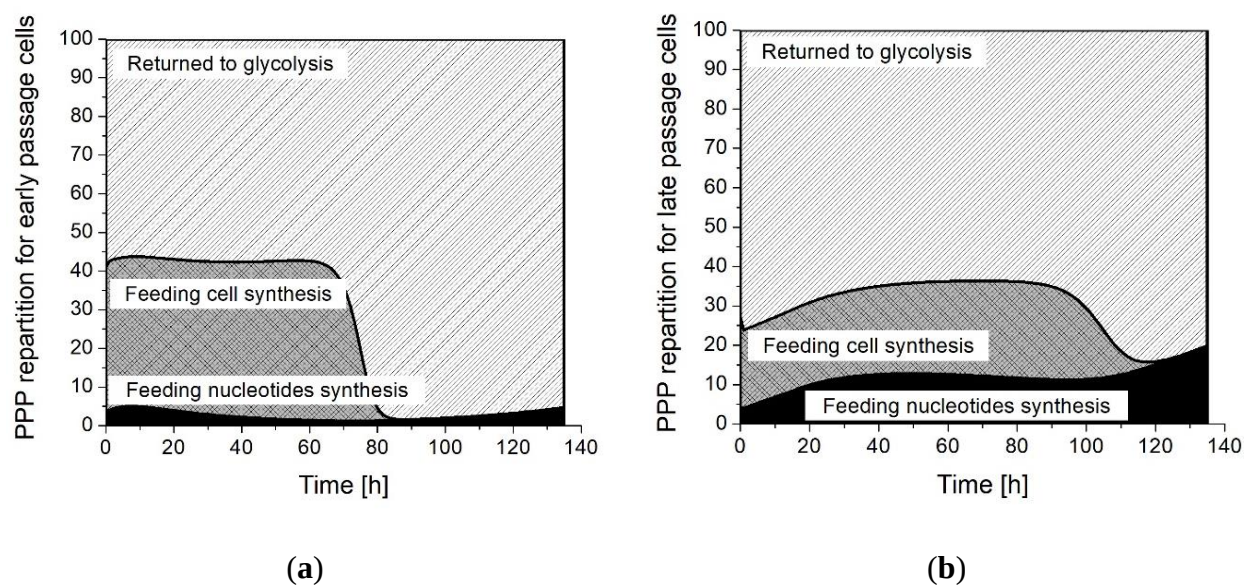
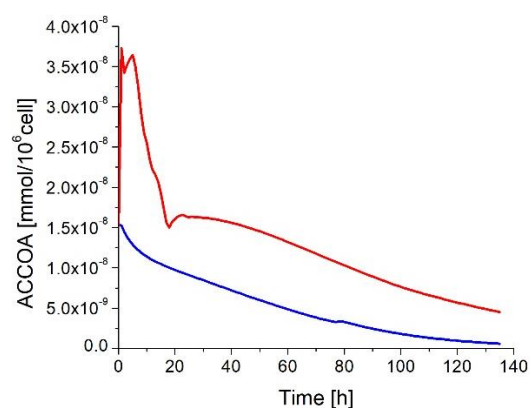


Figure 3.10: Flux distribution in PPP.

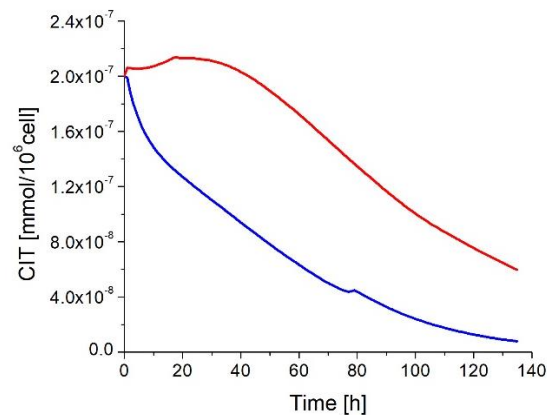
(a) P4 cell culture; (b) P9 cell culture. ■ Returned to Glycolysis, ▨ Feeding cell synthesis, ■ Feeding nucleotides synthesis.

3.5.5 P9 cells maintain a higher TCA activity

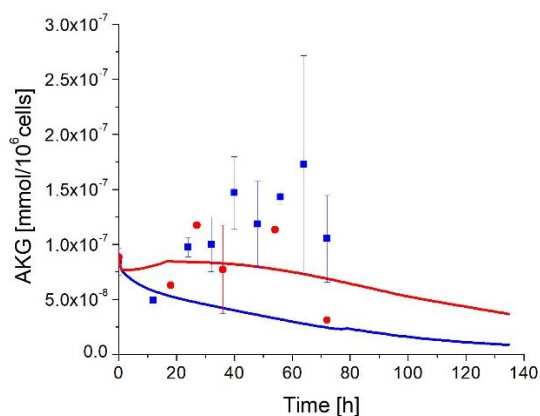
The impact of successive cell passages on TCA cycle activity has also been studied following the cell concentration of major TCA intermediates such as malate (MAL), succinate (SUC), alpha-ketoglutarate (AKG) and fumarate (FUM). The other TCA intermediate concentrations such as acetyl-CoA (ACCOA), citrate (CIT), succinyl-CoA (SCOA) and oxaloacetate (OXA) were simulated by the model (Figure 3.11). SUC and AKG concentrations showed similar but specific behaviours in early and late passages. SUC concentration remained constant in both cultures at an average value of $3.3 \times 10^{-7} \text{ mmol} \cdot 10^{-6} \text{ cells} \cdot \text{h}^{-1}$, for increasing briefly from 54 h in P4 cells. In both conditions, AKG increased from 8.6×10^{-8} to $1.3 \times 10^{-7} \text{ mmol} \cdot 10^{-6} \text{ cells} \cdot \text{h}^{-1}$ at 54 h before decreasing slightly. MAL and FUM concentrations showed similar behaviour in both P4 and P9 cells with a decrease the first 10 h (MAL) and 26 h (FUM) for increasing thereafter. In P9 cells, MAL cell concentration stayed higher in P9 compared to P4 cells, while FUM was lower in P4 cells. Interestingly, MAL and FUM showed opposite behaviours comparing early and late cell passages. In the metabolic network used, FUM is synthesized by succinate dehydrogenase (SDH) but also by ASL, thus, P4 cells have a higher FUM concentration due to a higher activity of ASL in the Urea cycle compare to P9 cells. Using model simulation, the concentrations of non-measured metabolites were elucidated, showing higher concentrations for all simulated TCA intermediates in P9 cells except for OXA. Higher amount of TCA intermediates, which is a marker of a more active TCA cycle for P9 cells, agrees with the above-mentioned observation of a respiratory metabolism in these late passage cells. However, to be noticed, the model's description of experimental data is not really accurate.



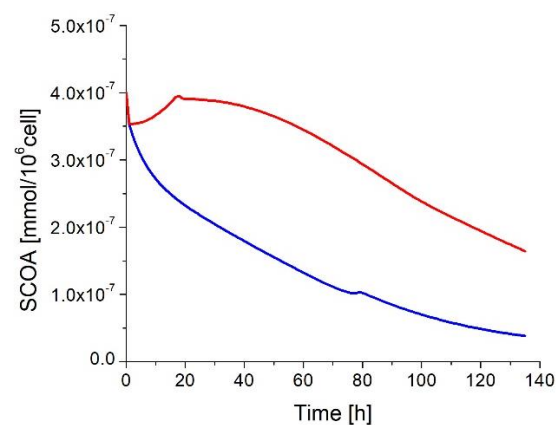
(a)



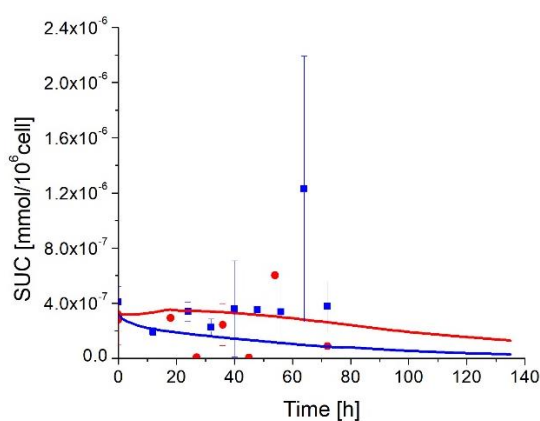
(b)



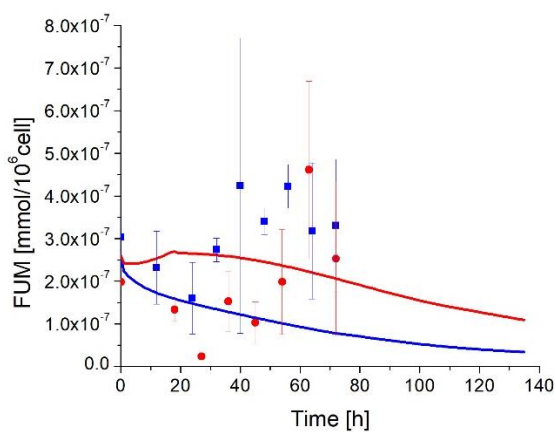
(c)



(d)

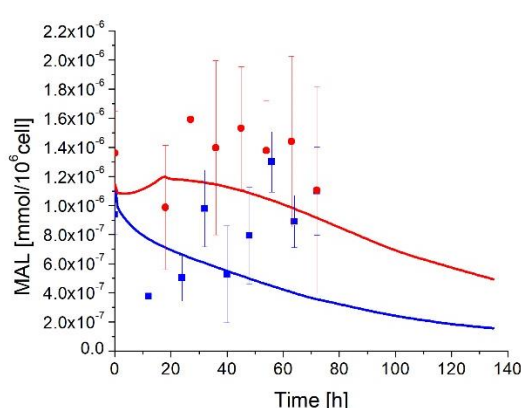


(e)

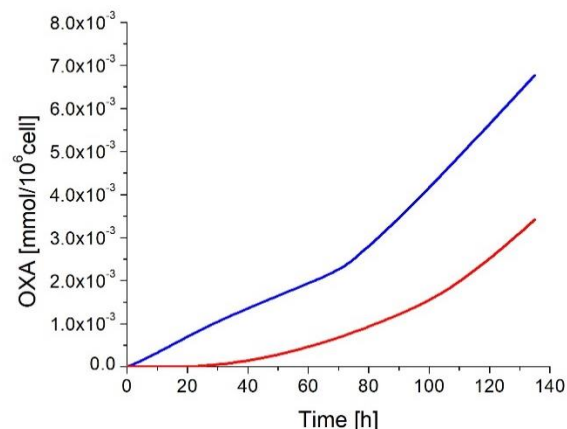


(f)

Figure 3.11: Effect of cell passage on TCA cycle intermediates concentration.



(g)



(h)

Figure 3.11: Effect of cell passage on TCA cycle intermediates concentration. (continue)

(a) Acetyl-CoA concentration; (b) Citrate concentration; (c) Alpha-ketoglutarate concentration; (d) Succinyl-CoA concentration; (e) Succinate concentration; (f) Fumarate concentration; (g) Malate concentration; (h) Oxaloacetate concentration. ■ are P4 cells experimental data, ● are P9 cells experimental. Data Average values are shown for both passages (n=3). Blue line is P4 cells simulation, red line is P9 cells simulation.

Fluxes coming from the glycolysis have a magnitude of $10^{-4} \text{ mmol} \cdot 10^{-6} \text{ cells} \cdot \text{h}^{-1}$ (Figure 3.12), whereas TCA metabolic intermediates show concentrations magnitude of $\sim 10^{-7} \text{ mmol} \cdot 10^{-6} \text{ cells}$. Thus, a slight variation between two successive reaction fluxes could lead to a high divergence of a metabolite concentration. This may explain the high sensitivity of model parameters involved in 6 TCA cycle reactions, such as pyruvate dehydrogenase (PDH), citrate synthase (CS), aconitase/isocitrate dehydrogenase (CITS), SDH, ASTA and AAtoSUC. Interestingly, sensitive parameters variation between P4 and P9 cells are not similar for all parameters (Table 3.1). Indeed, AAtoSUC is the most modified reaction, with a factor of 22 for the maximum reaction rate and a factor of ~ 3 for its affinity constant. At the opposite, CS and CITS show a smaller variation of 1.2x of their maximum reaction rate and ASTA and SDH show no modification of their parameters value. However, model simulations are within experimental error of experimental data and tend to follow the observed trends. Interestingly, all TCA simulated fluxes show higher values in P9 cells compared to P4 cells. This result can be attributed to the higher original flux from pyruvate to the TCA cycle and PDH in P9 cells, as well as the non-

accumulation of TCA intermediates in model simulations. The higher TCA activity of P9 cells do not lead to a higher growth rate compared to P4 cells. Thus, due to cells senescence, a high amount of bioenergetic metabolites may be required for P9 cells maintenance.

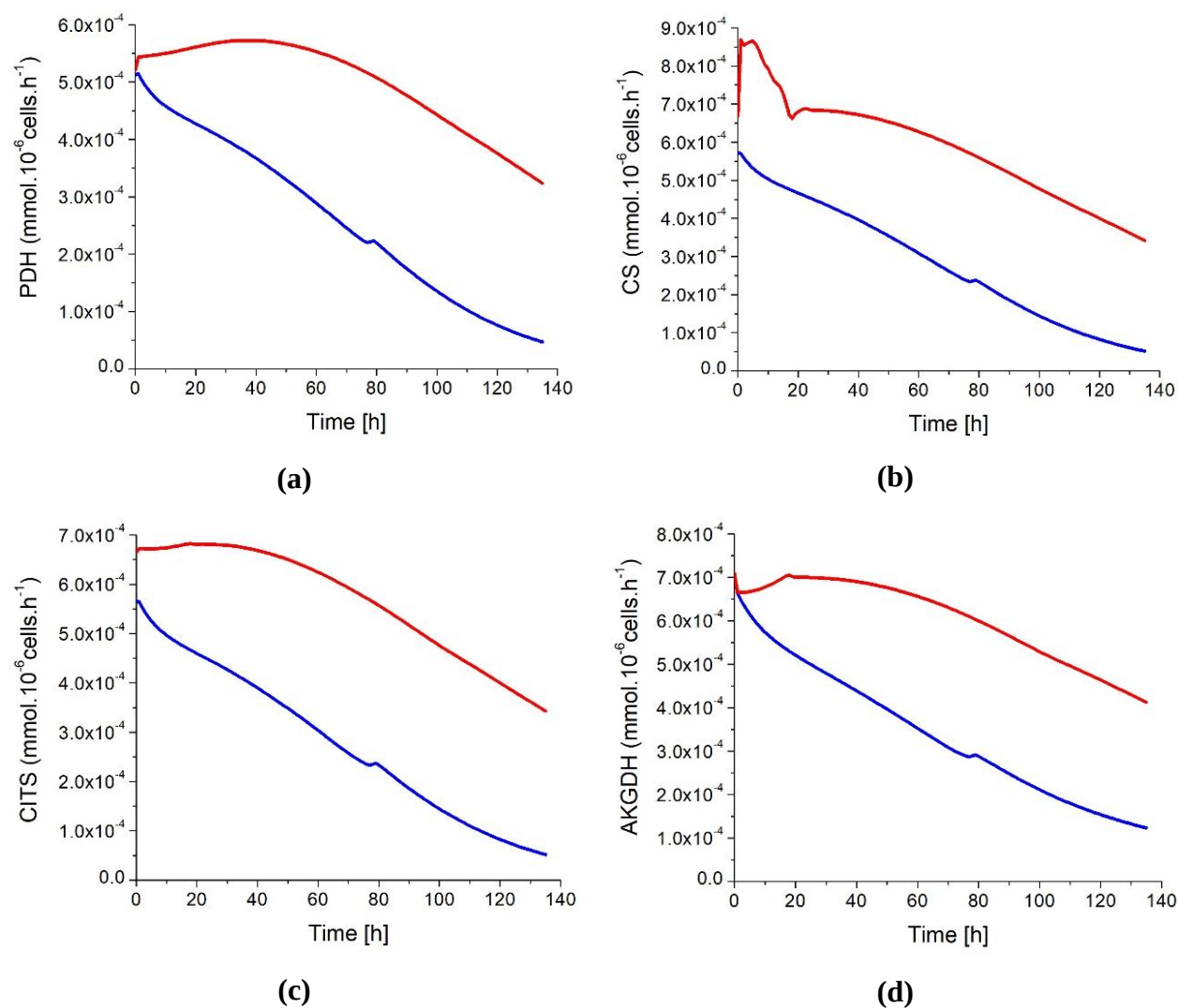


Figure 3.12: TCA intermediates flux profile.

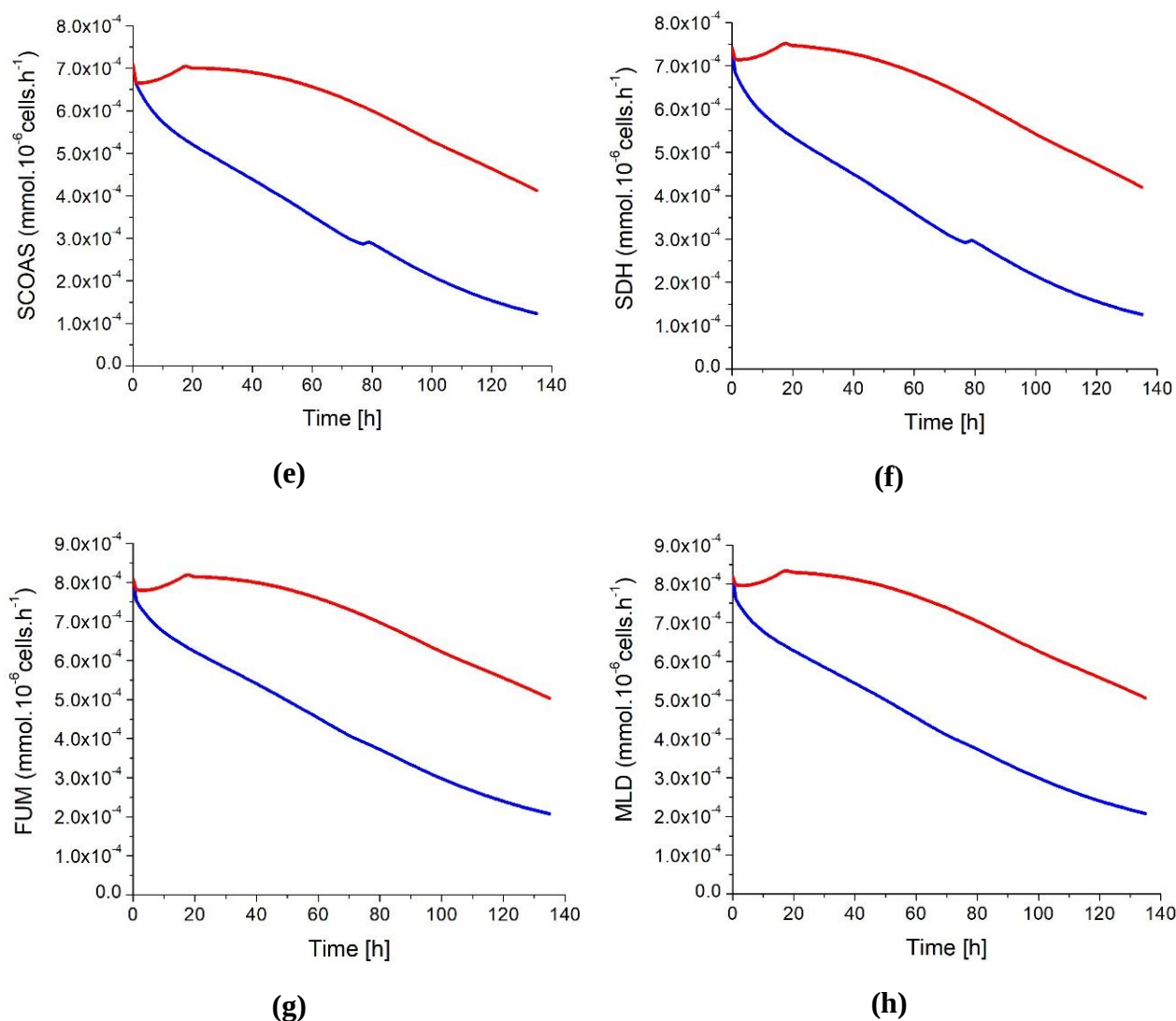


Figure 3.12: TCA intermediates flux profile. (continue)

(a) Pyruvate dehydrogenase flux; (b) Citrate synthase flux; (c) aconitase/isocitrate dehydrogenase flux; (d) Alpha ketoglutarate dehydrogenase flux; (e) Succinyl-CoA synthetase flux; (f) Succinate dehydrogenase flux; (g) Fumarase flux; (h) Malate dehydrogenase flux. Blue line is P4 cell culture, red line is P9 cell culture.

3.5.6 P9 cells support a higher ATP turnover rate than P4 cells

Using model simulation, it was possible to estimate the global ATP turnover rate summing the ATP producing reactions of the defined network. In agreement with an active TCA cycle, it is

clear that the ATP turnover rate is higher in P9 cells with a total ATP production rate starting from 4.9×10^{-3} and increasing at a stable value of $6.2 \times 10^{-3} \text{ mmol} \cdot 10^{-6} \text{ cells} \cdot \text{h}^{-1}$ (Figure 3.13). Oppositely, the ATP turnover rate in P4 cells regularly decreased from an initial value of 4.9×10^{-3} to $1.2 \times 10^{-3} \text{ mmol} \cdot 10^{-6} \text{ cells} \cdot \text{h}^{-1}$ at the end of the simulation.

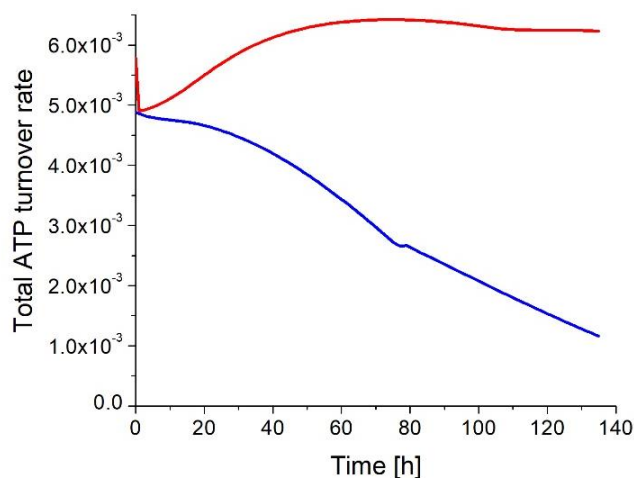


Figure 3.13: Total ATP turnover rate of early and late passage cells.

Blue line is P4 cells simulation, red line is P9 cells simulation.

Among the major roles of the TCA cycle, recycling nucleotide shuttles fuelling ATP regeneration from oxidative phosphorylation is a priority. Model simulations thus allowed questioning cell metabolism determining specific contributions of glycolysis, TCA cycle and respiration on ATP turnover rate (Figure 3.14). In glycolysis, PGK and PK contribute to ATP recycling whereas in TCA cycle succinyl-CoA synthetase (SCOAS) and SDH are directly contributing in addition to the other reactions feeding proton shuttles to the oxidative phosphorylation reactions leading to massive ATP regeneration. In P4 cells, glycolysis accounts for more than 45% of total ATP turnover while in P9 cells, ATP is mainly recycled via the oxidative phosphorylation reactions. This difference in ATP turnover rate as well as on its metabolic location may both represent efficient biomarkers of cell phenotypic loss with passages: early passage cells exhibiting a glycolytic metabolism with a high lactate-to-glucose ratio, whereas late passage senescent cells show increasing respiratory metabolism. These results are in agreement with other publications suggesting that glycolysis is the main energetic support for healthy stem cells (Estrada et al., 2012; Kondoh et al., 2007).

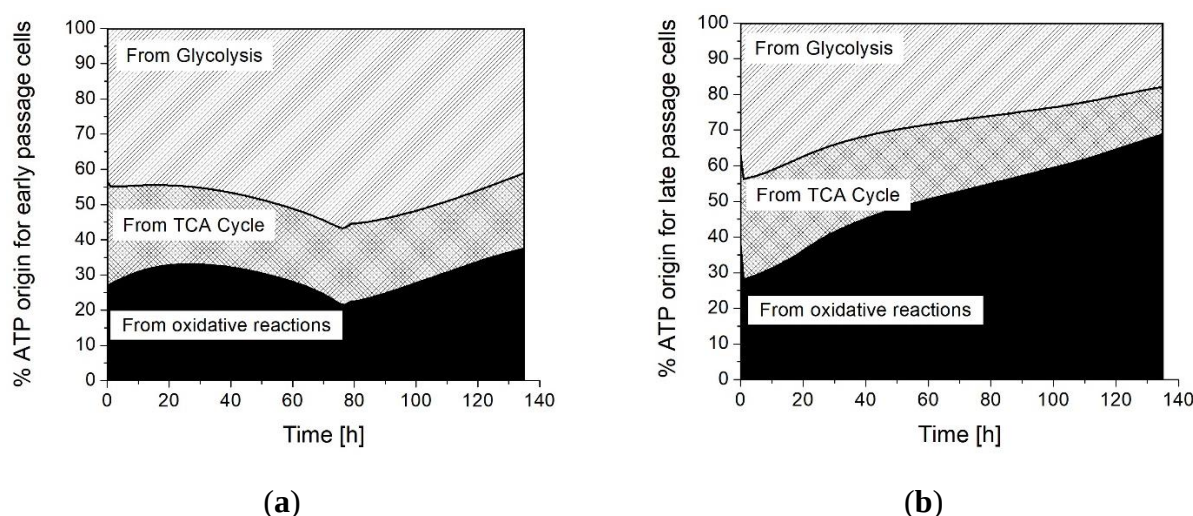


Figure 3.14: Distribution of ATP turnover origin between glycolysis, TCA cycle and oxidative phosphorylation.

(a) P4 cell culture; (b) P9 cell culture. ■ ATP production from glycolysis, ■ ATP production from TCA cycle, ■ ATP production from respiration.

In this work, because all energetic and redox nucleotides were quantified in the cells, these were also simulated by the model (Supplementary material, Figure 3.20). However, since nucleotides ratio were used in model kinetic expressions, we have also simulated the ratios which provide a direct view on regulatory mechanisms involving the cell energetic state (Figure 3.15). Interestingly, comparing nucleotides concentration showed no clear differences between P4 and P9 cells (Figure 3.20), while the analysis of nucleotides ratio reveals clear distinct behaviours between the two-cell ages. P9 cells ATP-to-ADP ratio regularly decreases from 13.0 to 5.1, while this energetic ratio stays constant and at a lower level in P4 cells; between 2.3 ± 0.6 to 4.8 ± 3.2 observed experimentally and simulated by the model. At the opposite, the AMP-to-ATP ratio in P9 cells show a constant slight increase from $2.6 \pm 0.5 \times 10^{-2}$ to $10.2 \pm 9.2 \times 10^{-2}$, at a lower level than in P4 cells in which this ratio evolves with no clear trend between $2.9 \pm 0.3 \times 10^{-1}$ and $1.5 \pm 1.1 \times 10^{-1}$. Interestingly, the simulation of the ATP-to-ADP ratio closely reflects experimental data, while model simulations trend slightly differs with experimental values for the AMP-to-ATP ratio. The ATP and ADP concentrations agree with previous results in CHO cell lines (Ghorbaniaghdam et al., 2014; Ghorbaniaghdam et al., 2013; Robitaille et al., 2015), thus leading to similar ATP-to-ADP ratio levels. However, WJMSCs show an AMP concentration five times higher than for CHO cells with a value around $5 \times 10^{-7} \text{ mmol} \cdot 10^{-6} \text{ cells}$. Taking the higher ATP-to-

ADP ratios observed (and simulated) in P9 cells, which agree with a respiratory metabolism, the low AMP-to-ATP ratio observed (and simulated) was expected in P9 cells. Interestingly, both experimental ATP-to-ADP and AMP-to-ATP ratios tend to reach similar values at the end of the cultures, which coincided with cell confluency in P4 culture and growth rate reduction (see above). Hardie et al. proposed a high AMP-to-ATP ratio as a marker of oxidative stress (Hardie & Hawley, 2001). Moreover, they demonstrated that an oxidative stress could activate the AMP-activated protein kinase (AMPK) leading to the inhibition of ATP-consuming pathways such as glucose uptake, reduction of cell growth and activation more efficient ATP-producing pathways (Hardie & Carling, 1997; Hardie, Hawley, & Scott, 2006). Our results with WJMSCs thus suggest the multipotent stem/stromal cell phenotype can support a higher oxidative stress level, a hypothesis also supported by a glycolytic metabolism, while cell phenotype loss towards differentiation impede P9 cells to support such an oxidative stress, leading to activation of a respiratory metabolism.

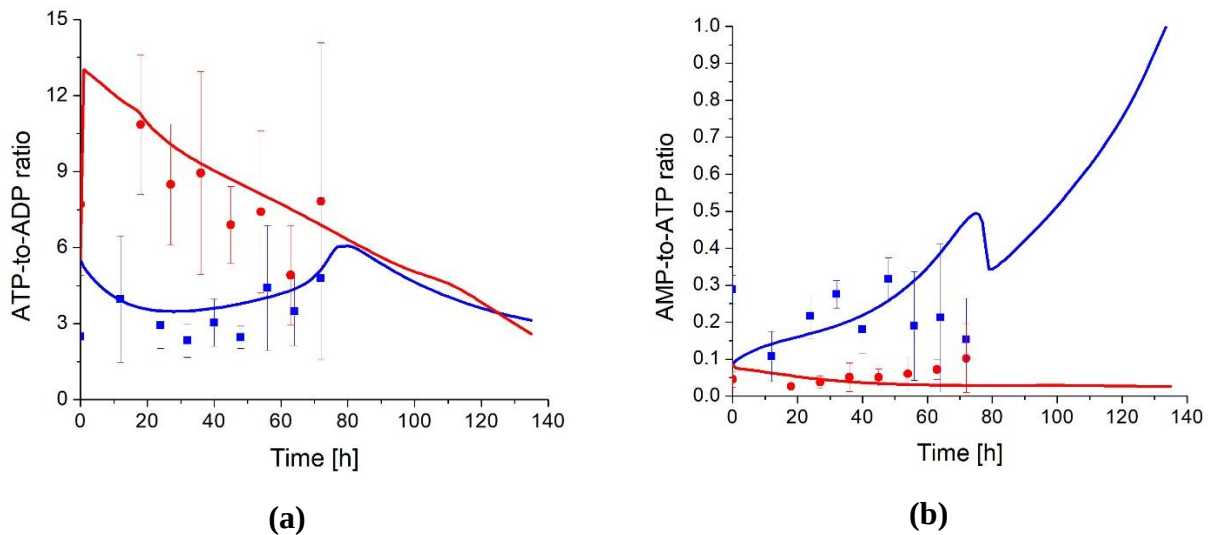


Figure 3.15: Effect of cell passage on energetic nucleotides ratio.

(a) ATP-to-ADP ratio; (b) AMP-to-ATP ratio. ■ are P4 cells experimental data, ● are P9 cells experimental. Data Average values are shown for both passages (n=3). Blue line is P4 cells simulation, red line is P9 cells simulation.

Urea cycle activity is higher in P4 cells

The urea cycle activity is known to be modulated with immunosuppressive activity (Bogdan, 2001; Rodriguez et al., 2007). Indeed, our results (Figure 3.16) confirm MLR data showing no significant differences between early and late passage conditions, although we have noticed P4 cells show a tendency of expressing higher immunosuppressive traits than P9 cells comparing glycolysis, TCA and energetic behaviours. Experimental data of extracellular arginine (EARG), urea, citrulline (CTR) and nitric oxide (NO) show similar trends for both P9 and P4 conditions, although P9 cells ornithine (ORN) concentration shows a higher increase that is significant for some late data points compared to P4 conditions. Model simulations of ORN agree with experimental data accounting to the sensitive parameter $vmax_{OCT}$ which allows a close description of ORN concentration. Interestingly, simulations show a higher consumption of EARG and a higher production of NO and UREA in P4 cells. A high EARG consumption and NO production are markers of immunosuppressive activity (Bronte & Zanovello, 2005; Sato et al., 2007), thus even if there are no significant differences between P4 and P9 cells, it seems that the passage effects overlaps and masks the immunosuppressive phenotype.

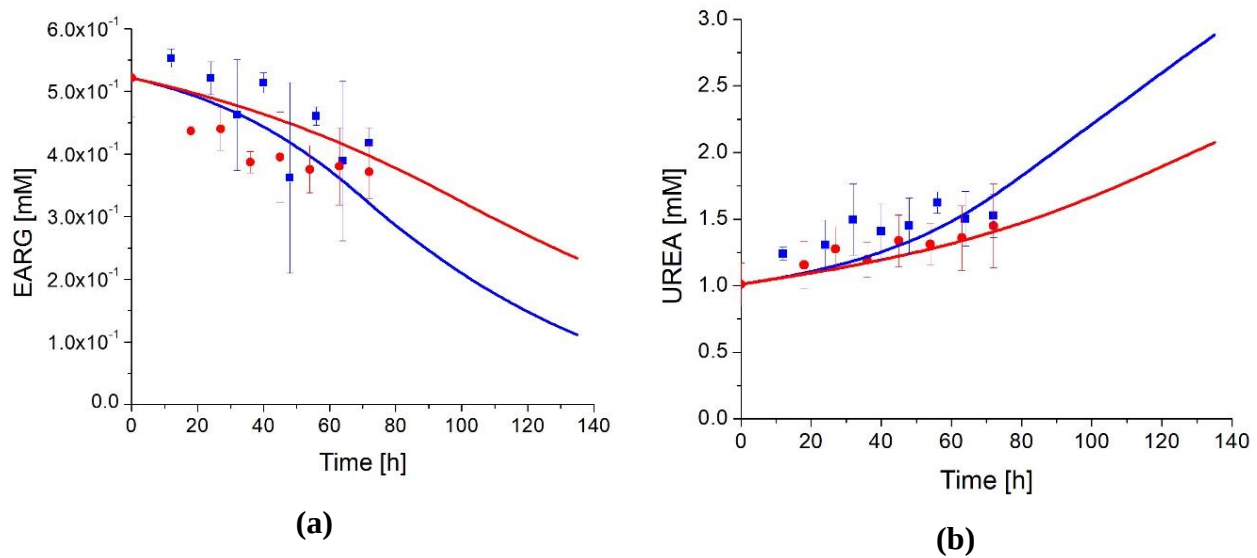


Figure 3.16: Effect of cell passage on urea cycle intermediates.

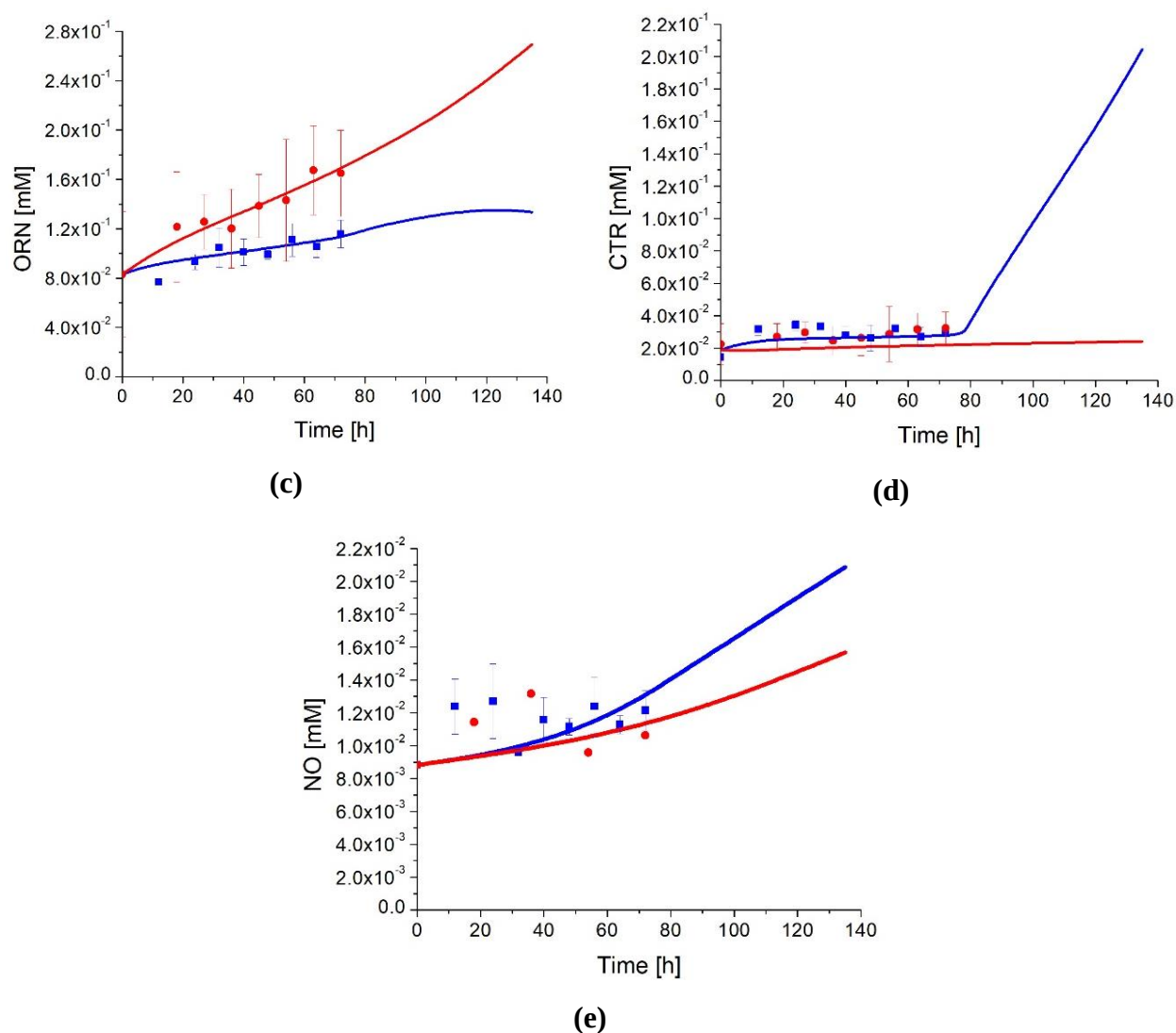


Figure 3.16: Effect of cell passage on urea cycle intermediates. (continue)

(a) Extracellular arginine concentration; (b) Extracellular urea concentration; (c) Ornithine concentration; (d) Citrulline concentration; (e) Nitric oxide concentration. ■ are P4 cells experimental data, ● are P9 cells experimental. Data Average values are shown for both passages (n=3). Blue line is P4 cells simulation, red line is P9 cells simulation.

The analysis of simulated fluxes allows further understanding the experimental concentration results (Figure 3.17). While P9 ARGt activity remains higher than in P4 cells and diverging until the end of the culture, all other enzymes of urea cycle show a higher activity in the P4 cells compared to P9 cells. ARG1 and NOS have a similar time-profile in both cells. P4 OCT activity, which shows being among sensitive parameters with a 0.73x decrease of value in P9 cells,

slightly and continuously increases with time while staying higher than in P9 cells. ASS and ASL activities are higher in P4 cells before 80 h, corresponding to growth cessation, for then decreasing to a similar value of P9 cells. Thus, the urea cycle shows being more active in P4 cells compared to P9 cells, without, however, observing significant differences in metabolites concentration. This higher urea cycle activity led to a high consumption of EARG and production of NO, two biomarkers of immunosuppressive activity (Bogdan, 2001; Bronte & Zanovello, 2005; Hammami, Chen, Murschel, et al., 2012). Thus, even if P4 cells show no significant immunosuppressive differences than P9 cells, they clearly present a metabolic activity known being observable with an immunosuppressive activity. Finally, as stated above, there are clear evidences that the passage effect is overlapping with that from immunosuppressive phenotype difference, and this result is of high importance developing cell therapy strategies.

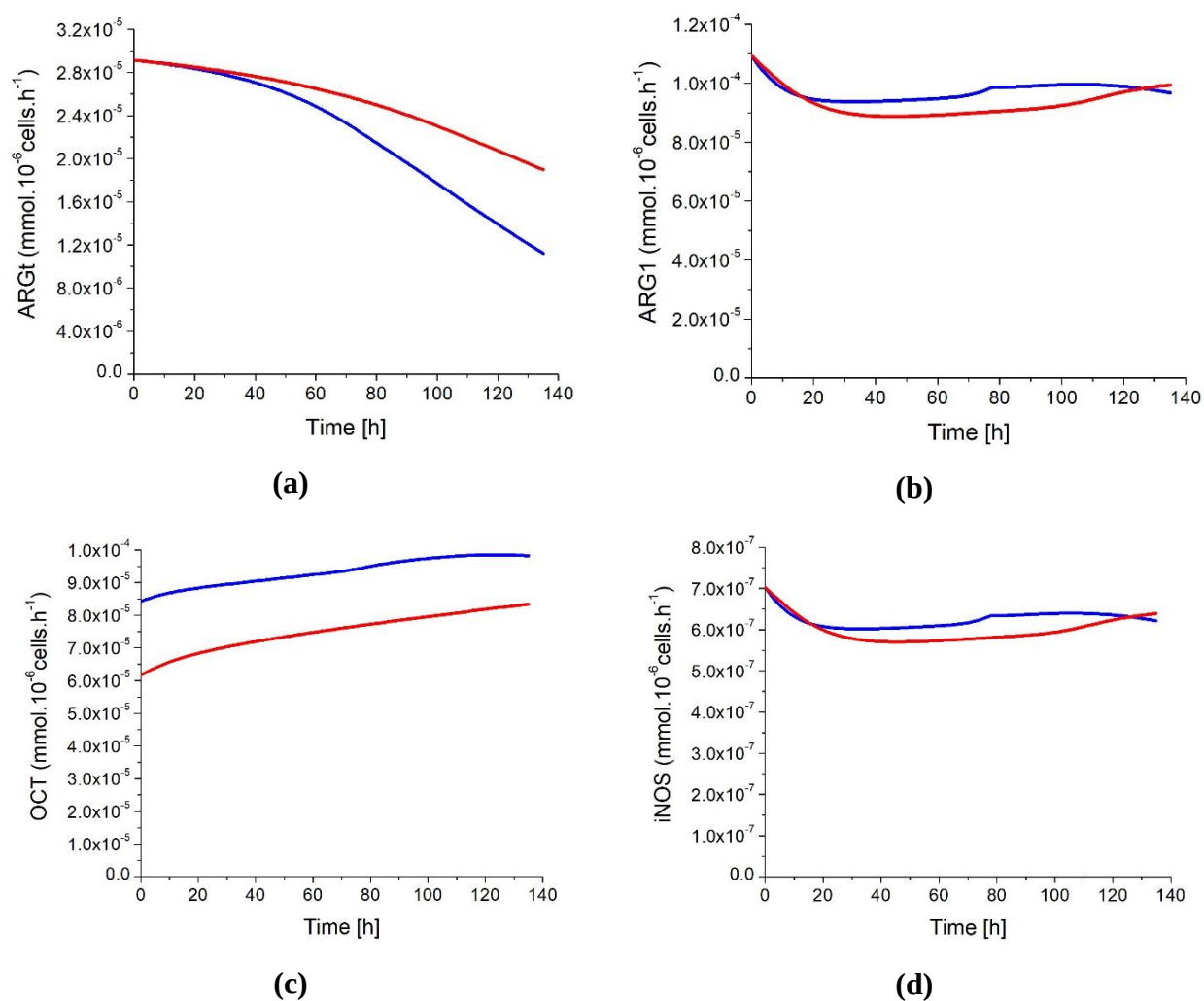


Figure 3.17: UREA cycle fluxes.

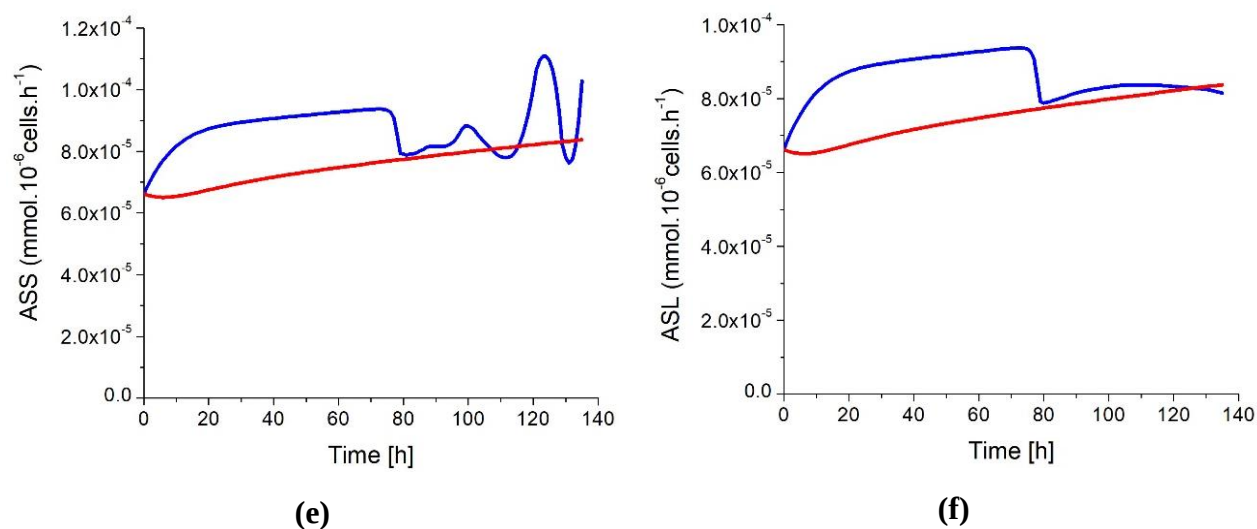


Figure 3.17: UREA cycle fluxes. (continue)

(a) Arginine transferase flux; (b) Arginase-1 flux; (c) Ornithine carbamoyltransferase flux; (d) Inducible nitric oxide synthetase flux; (e) Argininosuccinate synthase flux; (f) Argininosuccinate lyase flux. Blue line is P4 cell culture, red line is P9 cell culture.

3.5.7 P4 cells show a lower need in extracellular tryptophan

Tryptophan metabolism is also well known as a key biomarker of an immunosuppressive activity (Fallarino et al., 2003; Mellor & Munn, 1999). Indeed, in agreement with our MLR data, experimental ETRP concentration data show a tendency of a faster depletion in P4 cell culture that is not significant for all data points (Figure 3.18). P4 ETRP concentration continuously decreases, with model simulations suggesting this essential amino acid being a potential limiting nutrient of cell growth, but occurring hypothetically (from model simulations) after reaching confluency. At the opposite, with P4 and P9 cells being not significantly different, KYN concentration increased during cell growth, for decreasing from ETRP depletion (estimated from model simulations).

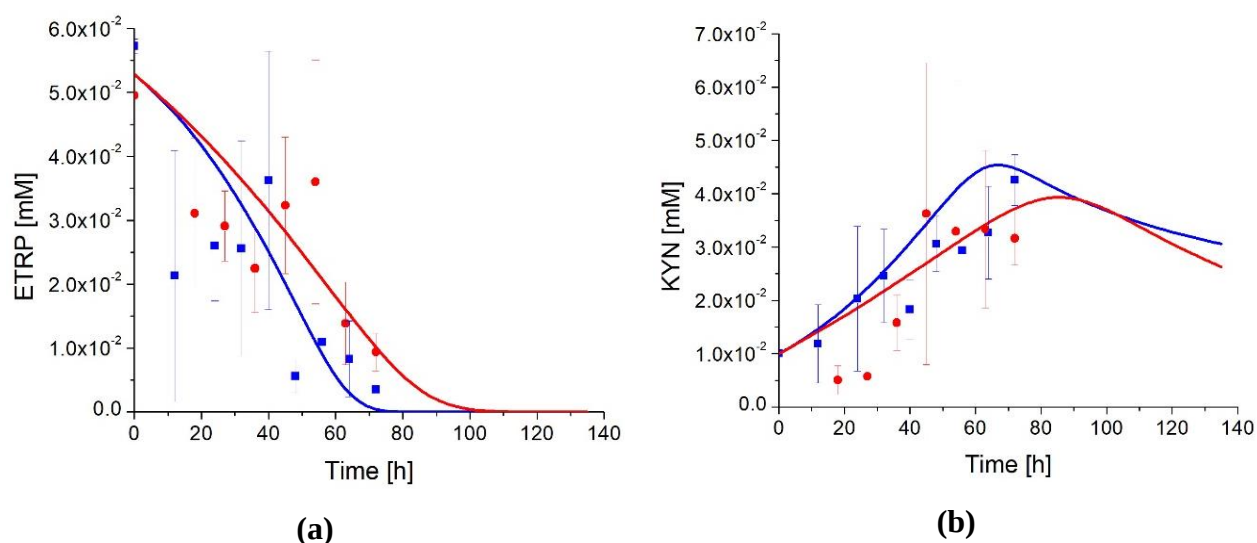


Figure 3.18: Effect of cell passage on tryptophan consumption.

(a) Extracellular tryptophan concentration; (b) Extracellular kynurenine concentration. ■ are P4 cells experimental data, ● are P9 cells experimental. Data Average values are shown for both passages (n=3). Blue line is P4 cells simulation, red line is P9 cells simulation.

Interestingly and as previously shown for other metabolic sub-pathways, model simulations allow obtaining a clearer view on tryptophan metabolism. The model simulates a higher tryptophan specific consumption rate in P9 cells compared to P4 cells (Figure 3.19). P4 and P9 IDO fluxes both start at a similar value for then decreasing respectively at ~10 h before growth cessation. In the case of kynureninase (KOT) flux, both P4 and P9 cells also start at a similar value. Then, the

flux rapidly increases in P9 cells for decreasing from 60 h, while the flux stayed at a constant value in P4 cells for decreasing with a similar trend as for P9 cells. Similarly to glucose consumption, P4 cells show a lower IDO activity but are consuming ETRP at a faster rate than P9 cells due to a higher cell growth rate. This faster tryptophan depletion suggests that P4 cells behave such as macrophages which inhibit T-cells response against maternal foetus (Munn et al., 1999). This faster tryptophan depletion in P4 cells, a phenomenon representing a known biomarker of immunosuppressive phenotype, may seem contradictory with the higher tryptophan specific uptake rate in P9 cells. However, the immunosuppressive phenotype does not rely on an uptake rate rather than on the maintain of a low extracellular concentration in tryptophan. Therefore, in agreement with all of the above, early P4 passage WJMSCs show characteristics that are specific to immunosuppressive cells when compared to late P9 passage cells, but this hypothesis has been showed biased by the phenotype senescence phenomenon induced with cell passages that is overlapping with the immunosuppressive phenotype.

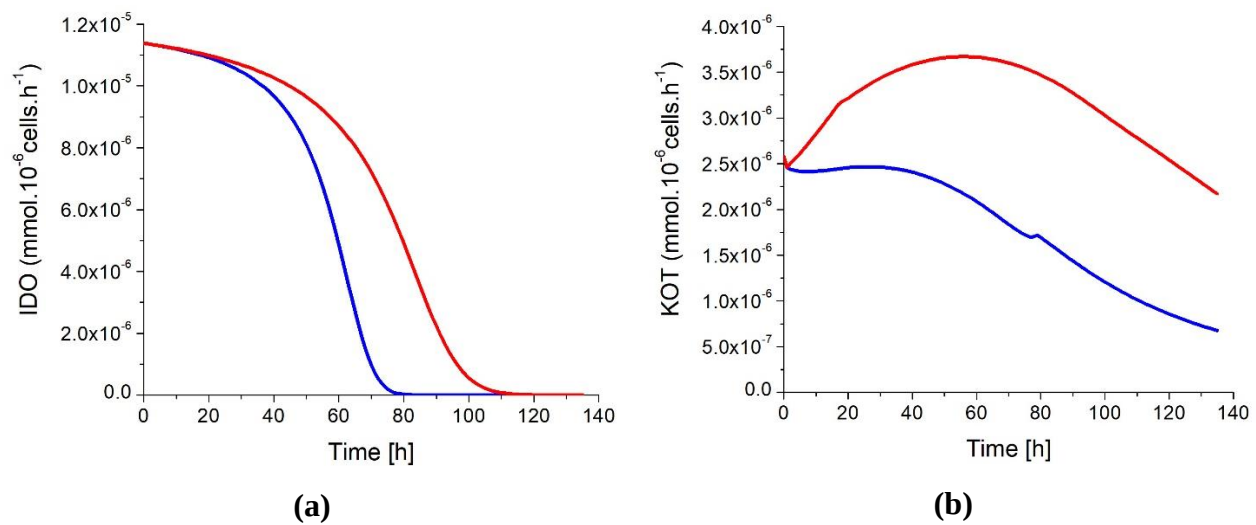


Figure 3.19: ETRP metabolism fluxes.

(a) Indoleamine 2,3-dioxygenase flux; (b) Kynureninase flux. Blue line is P4 cell culture, red line is P9 cell culture.

3.6 Conclusion

In addition to providing a wide set of metabolomics data, the present study has led to the development of a kinetic metabolic model specifically adapted to describe WJMSCs. We here compared early (P4) passage cells, which express highly variable immunosuppression capacity among samples, and late (P9) passage cells showing clear and consistent low immunosuppressive capacity. Covering the central carbon metabolism, including glycolysis, PPP and TCA cycle, the energetic metabolism as well as pathways that are known to be differentially involved in immunosuppressive cells, allowed probing and identifying biomarkers that are specific to immunosuppressive cells. In support to the analysis of metabolomics data, model simulations enabled to highlight that P4 cells still exhibit immunosuppressive-related metabolism. A series of coherent biomarkers were thus identified pointing out that immunosuppressive cells may favour a glycolytic metabolism, gradually switching to an oxidative phosphorylation metabolism while progressing with cell passages. P4 cells have a more bioenergy-saving metabolism compared to P9 cells that require a high amount of bioenergetic metabolites for cells maintenance. These differences leads to different origin for ATP production. P4 cells can only afford a glycolysis metabolism where P9 cells need a high TCA cycle activity without reaching a growth as fast as P4 cells. The observation of the AMP to ATP ratio suggests that P9 cells have a lower tolerance in oxidative stress, a possible cause of previously described differences. Moreover, even if P4 cells are not significantly immunosuppressive compared to P9 cells, we demonstrated that an earlier passage WJMSC could express some immunosuppressive biomarkers and that P4 cells are already too advanced to express clear phenotype, leading to an overlapping of immunosuppressive phenotype and senescent phenotype. Because immunosuppressive cell metabolism must be studied at different passages, it is important to identify the earliest impact of this difference of passage in cell metabolic behaviour. Thus, this work will be useful to discriminate effects specifically attributed to the immunosuppressive capacity and then lead to the discovery of specific immunosuppressive biomarkers. All hypotheses drawn in this work need to be validated comparing confirmed immunosuppressive cells to late passage confirmed non-immunosuppressive cells. Finally, the proposed metabolic model can be a useful tool to further describe immunosuppression cell biosystems as well as studying culture condition improvement, such as medium composition in essential nutrients and amino acids.

3.7 APPENDIX A

Every intracellular metabolite concentration is described by a material balance (Equation A1):

$$\frac{dM}{dt} = S \cdot v - \mu \cdot M - \mu \cdot \varepsilon \quad (1)$$

where S is the stoichiometric matrix of the network fluxes, v is the vector of the reaction flux ($\text{mmol} \cdot \text{gDW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), μ is the specific growth rate (h^{-1}), and M is the vector of the 59 metabolites concentration. The cell dilution term ($\mu \cdot M$) describes the dilution of intracellular metabolites from cell division of a mother cell into two daughter cells, each with similar final volume and composition. Moreover, the consumption of intra and extracellular metabolites into cell material for growth is also described with ($\mu \cdot \varepsilon$) where ε is the stoichiometric coefficient of the “i” metabolite integrated into biomass (i.e. no more available to reactions).

The biomass evolution is described as follows (Equation A2):

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (2)$$

where X is cell concentration ($10^6 \text{ cells mL}^{-1}$), and “ μ ” is the specific growth rate (h^{-1}).

Every biochemical reaction (i.e. v_i flux rate) is mathematically described according to the Michaelis-Menten kinetic representation, as previously described and validated for eukaryotic cells (Ghorbaniaghdam et al., 2014; Ghorbaniaghdam et al., 2013; Robitaille et al., 2015). All metabolites involved in the reaction network, either as substrate or co-factor, are considered with Michaelis-Menten constants specific to a substrate and a reaction. When the substrate (or the co-factor) is an energetic nucleotide, such as NADH, NADPH, NAD, NADP, ATP, ADP, AMP, ratios are used to improve model interpretation of kinetics fluxes as previously demonstrated for various cell biosystems (Dash, Li, Kim, Saidel, & Cabrera, 2008; Ghorbaniaghdam et al., 2014; Ghorbaniaghdam et al., 2013; Robitaille et al., 2015) (Eq. 3). The cell specific growth rate (μ) has been approximated applying Monod kinetics with multiple intracellular substrates such as the major precursors of cell building blocks, as successfully applied in previous works (Cloutier et al., 2007; Ghorbaniaghdam et al., 2014; Ghorbaniaghdam et al., 2013; Robitaille et al., 2015) (Equation 4).

$$v_{E_j} = v_{E_j,max} \cdot \prod_i \frac{M_i}{M_i + K_{m_{E_j}M_i}} \quad (3)$$

$$\mu = v_{growth} = v_{growth,max} \cdot \prod_j \frac{M_j}{K_{m_{growth},M_j} + M_j} \quad (4)$$

where v_{E_i} is the flux rate ($\text{mmol } 10^{-6}\text{cells h}^{-1}$) of the enzymatic reaction catalysed by the enzyme E_i , $v_{E_i,max}$ is the maximum reaction rate of the flux catalyzed by the enzyme E_i ($\text{mmol } 10^{-6}\text{cells h}^{-1}$), M_i are each substrate and co-factors of M considered in flux kinetics, μ is the cell specific growth rate (h^{-1}), $v_{growth,max}$ is the cell maximum specific growth rate (h^{-1}), M_j are each substrate and co-factors of M considered in cell growth kinetics, and $K_{m_{E_j}M_i}$ and K_{m_{growth},M_j} are the Michaelis-Menten constants respectively for the M_j involved in the cell specific growth rate and in the cell biomass synthesis, respectively.

As proposed in Nolan and Lee (Nolan & Lee, 2011), exchanges of metabolites between intracellular and extracellular volumes were not considered to be controlled by membrane protein transporters but by intracellular enzymes. This model simplification is also supported considering that the extracellular concentration of the metabolites is higher than their associated membrane transporter half-saturation Michaelis-Menten constant (Hundal, Rennie, & Watt, 1989). Thus, the uptake or secretion of extracellular metabolites is controlled by several intracellular reactions rather than their transporter.

As in previous works (Ghorbaniaghdam et al., 2014; Ghorbaniaghdam et al., 2013; Robitaille et al., 2015), the main regulation mechanisms of activation or inhibition were considered in the flux kinetics. Indeed, on the one hand, hexokinase (v_{HK}), phosphoglucose isomerase (v_{PGI}) and reverse lactate dehydrogenase (v_{LDH}) are respectively inhibited by glucose-6-phosphate (G6P), phosphoenolpyruvate (PEP) and pyruvate (PYR). On the other hand, phosphofructokinase (v_{PFK}), lactate dehydrogenase (v_{LDH}) and hexokinase (v_{HK}) are activated by the AMP-to-ATP ratio, and finally, pyruvate kinase (v_{PK}) is activated by fructose-6-phosphate (F6P). The reactions involving an inhibition or activation mechanism were respectively described according to the mathematical formulation of a non-competitive inhibition (Equation A5) and a non-essential activation (Equation A6) impacting the Michaelis-Menten mechanism of the main substrate, respectively, as described in Robitaille et al. (Robitaille et al., 2015).

$$V_{E_j} = V_{E_j, \max} \cdot \prod_i \frac{M_i}{M_i + K_{m_{E_j} M_i}} \cdot \left(\frac{I + K_{i_{E_j} I}}{I} \right) \quad (5)$$

$$v_{E_j} = v_{E_j, \max} \cdot \prod_i \frac{M_i}{M_i + K_{m_{E_j} M_i}} \cdot \left(\frac{M_p \cdot \left(1 + \frac{\beta A}{\alpha \cdot K_a} \right)}{K_{m_{E_j} M_p} \cdot \left(1 + \frac{A}{K_a} \right) + M_p \cdot \left(1 + \frac{A}{\alpha \cdot K_a} \right)} \right) \quad (6)$$

with I the inhibitor concentration and $K_{i_{E_j} I}$ the inhibition constant, A is the activator concentration, M_p the main substrate of the activated reaction, and α , β and K_a the activation constants.

3.8 APPENDIX B

The determination of parameters value was performed following an approach adapted from the step-by-step method, through model decomposition into sub-networks, developed by Rizzi et al. (Rizzi et al., 1997); starting with values from a previous work with CHO cells (Robitaille et al., 2015) as initial estimates. This approach allows minimizing manual manipulations by optimizing parameters value one sub-network at the time. At first, polynomial time-functions describing experimental data sets time-evolution of the various medium components and intracellular metabolites are determined, and used to define associated mass balances in the Ordinary Differential Equations (ODE) system. These mathematical functions, determined using the *polyfit* function of Matlab, only depend on the variable time. The amount of parameters value to be determined is thus significantly lowered. It is important to note that time evolution simulations of the non-measured metabolites were considered adequate when simulated within ranges found in literature, taking initial concentration from literature. Then, as the first step, a single metabolite only involved in one specific reaction is selected, and the polynomial function describing the time-evolution of this metabolite concentration is replaced by the appropriate biokinetic function. The value of the parameters used in this single reaction are then determined minimizing the following objective function (Equation A7) which defines model simulation error compared to experimental data sets (solved using the Matlab optimization function `lsqnonlin.m`):

$$\min \left(\sum_{n=1}^N \left(\frac{X_n^{EXP} - X_n^{MODEL}(p)}{\sigma_n} \right)^2 \right) \quad (7)$$

where p is the vector of the parameters involved in the undetermined reaction, X is the experimental concentration of the metabolite used to find these parameters, N is the number of experimental data points for the metabolite X , X_n^{EXP} is the n^{th} experimental data of X , $X_n^{MODEL}(p)$ is the model simulated value corresponding to the n^{th} experimental value depending on p , and finally σ_n is the standard deviation of the experimental measurement for each metabolite. Then, this procedure is repeated only to metabolites involved in one reaction, one at the time, keeping with the already determined parameters value but with time-evolution function for the others remaining to be determined. Metabolites simultaneously involved in two reactions were studied following the same procedure but one reaction at the time being kinetically released. In the case of complex cycles and parallel pathways, one metabolite was used to determine two

reactions in a single step. The successive steps used to calibrate this model are summarized in Table 3.4 (Supplementary materials). In some cases, intracellular metabolite concentration could not be determined experimentally and the initial concentration value was then taken from the value range normally found in literature. Each optimized parameter value was verified for its biological relevancy, from ranges found in literature. Initial values used for modelling are summarized in Table 3.5.

3.9 APPENDIX C

Once the parameters values were all determined, a sensitivity analysis was performed to identify sensitive parameters, i.e. parameters having a large influence on model simulation. The effect of varying parameters value of $\pm 15\%$, $\pm 25\%$ and $\pm 50\%$ from their optimal value on the global objective function (Equation A8) allowed identifying sensitive parameters.

$$\Delta = \sum_{n=1}^N \sum_{m=1}^M \left(\frac{X_{n,m}^{EXP} - X_{n,m}^{MODEL}(P)}{X_{n,m}^{EXP}} \right)^2 \quad (8)$$

With Δ the model output variation, N the number of experimental data points for each metabolite, M the number of metabolites, $X_{n,m}^{EXP}$, the n^{th} experimental value for the concentration of the metabolite m , and $X_{n,m}^{MODEL}(P)$ the simulated value corresponding to the n^{th} experimental data for the metabolite m calculated with the set of parameter values P . Highly sensitive parameters were those showing a variation of Δ higher than 10% for a small variation of $\pm 15\%$ of their value. However, this sensibility analysis was done with variation higher than 15% in order to validate the sensibility of the sensitive parameters

3.10 References

- Ahn, W. S., & Antoniewicz, M. R. (2011). Metabolic flux analysis of CHO cells at growth and non-growth phases using isotopic tracers and mass spectrometry. *Metabolic Engineering*, 13(5), 598-609.
- Bogdan, C. (2001). Nitric oxide and the immune response. *Nature immunology*, 2(10), 907-916.
- Bronte, V., & Zanovello, P. (2005). Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nature Reviews Immunology*, 5(8), 641-654.
- Chen, M.-Y., Lie, P.-C., Li, Z.-L., & Wei, X. (2009). Endothelial differentiation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Experimental hematology*, 37(5), 629-640.
- Cloutier, M., Perrier, M., & Jolicoeur, M. (2007). Dynamic flux cartography of hairy roots primary metabolism. *Phytochemistry*, 68(16), 2393-2404.
- Dash, R. K., Li, Y., Kim, J., Saidel, G. M., & Cabrera, M. E. (2008). Modeling cellular metabolism and energetics in skeletal muscle: large-scale parameter estimation and sensitivity analysis. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 55(4), 1298-1318.
- Dell'mour, M., Jaitz, L., Oburger, E., Puschenreiter, M., Koellensperger, G., & Hann, S. (2010). Hydrophilic interaction LC combined with electrospray MS for highly sensitive analysis of underivatized amino acids in rhizosphere research. *Journal of separation science*, 33(6-7), 911-922.
- Estrada, J., Albo, C., Benguria, A., Dopazo, A., Lopez-Romero, P., Carrera-Quintanar, L., . . . Bernad, A. (2012). Culture of human mesenchymal stem cells at low oxygen tension improves growth and genetic stability by activating glycolysis. *Cell death and differentiation*, 19(5), 743.
- Fallarino, F., Grohmann, U., Vacca, C., Orabona, C., Spreca, A., Fioretti, M. C., & Puccetti, P. (2003). T cell apoptosis by kynurenines *Developments in tryptophan and serotonin metabolism* (pp. 183-190): Springer.
- Ferrara, J. L., Levine, J. E., Reddy, P., & Holler, E. (2009). Graft-versus-host disease. *The Lancet*, 373(9674), 1550-1561.
- Fiehn, O. (2002). Metabolomics—the link between genotypes and phenotypes. *Plant molecular biology*, 48(1-2), 155-171.
- Gabrilovich, D. I., & Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 9(3), 162-174.
- Galipeau, J. (2013). The mesenchymal stromal cells dilemma—does a negative phase III trial of random donor mesenchymal stromal cells in steroid-resistant graft-versus-host disease represent a death knell or a bump in the road? *Cytotherapy*, 15(1), 2-8.
- Ghorbaniaghdam, A., Chen, J., Henry, O., & Jolicoeur, M. (2014). Analyzing clonal variation of monoclonal antibody-producing CHO cell lines using an in silico metabolomic platform. *PloS one*, 9(3), e90832.

- Ghorbaniaghdam, A., Henry, O., & Jolicoeur, M. (2013). A kinetic-metabolic model based on cell energetic state: study of CHO cell behavior under Na-butyrate stimulation. *Bioprocess and biosystems engineering*, 36(4), 469-487.
- Hammami, I., Chen, J., Bronte, V., DeCrescenzo, G., & Jolicoeur, M. (2012). L-glutamine is a key parameter in the immunosuppression phenomenon. *Biochemical and biophysical research communications*, 425(4), 724-729.
- Hammami, I., Chen, J., Murschel, F., Bronte, V., De Crescenzo, G., & Jolicoeur, M. (2012). Immunosuppressive activity enhances central carbon metabolism and bioenergetics in myeloid-derived suppressor cells in vitro models. *BMC cell biology*, 13(1), 1.
- Hardie, D. G., & Carling, D. (1997). The AMP-activated protein kinase. *The FEBS Journal*, 246(2), 259-273.
- Hardie, D. G., & Hawley, S. A. (2001). AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited. *Bioessays*, 23(12), 1112-1119.
- Hardie, D. G., Hawley, S. A., & Scott, J. W. (2006). AMP-activated protein kinase—development of the energy sensor concept. *The Journal of physiology*, 574(1), 7-15.
- Ho, A., Wagner, W., & Franke, W. (2009). Heterogeneity of mesenchymal stromal cell preparations. *Cytotherapy*.
- Hundal, H., Rennie, M., & Watt, P. (1989). Characteristics of acidic, basic and neutral amino acid transport in the perfused rat hindlimb. *The Journal of physiology*, 408(1), 93-114.
- Italiani, P., & Boraschi, D. (2015). From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation. *M1/M2 Macrophages: The Arginine Fork in the Road to Health and Disease*, 47.
- Kang, T. J., Yeom, J.-E., Lee, H. J., Rho, S. H., Han, H., & Chae, G.-T. (2004). Growth kinetics of human mesenchymal stem cells from bone marrow and umbilical cord blood. *Acta haematologica*, 112(4), 230-233.
- Kimball, E., & Rabinowitz, J. D. (2006). Identifying decomposition products in extracts of cellular metabolites. *Analytical biochemistry*, 358(2), 273-280.
- Kondoh, H., Leonart, M. E., Nakashima, Y., Yokode, M., Tanaka, M., Bernard, D., . . . Beach, D. (2007). A high glycolytic flux supports the proliferative potential of murine embryonic stem cells. *Antioxidants & redox signaling*, 9(3), 293-299.
- Krampera, M., Galipeau, J., Shi, Y., Tarte, K., & Sensebe, L. (2013). Immunological characterization of multipotent mesenchymal stromal cells—The International Society for Cellular Therapy (ISCT) working proposal. *Cytotherapy*, 15(9), 1054-1061.
- Le Blanc, K., & Ringden, O. (2007). Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *Journal of internal medicine*, 262(5), 509-525.
- Le Blanc, K., Tammik, C., Rosendahl, K., Zetterberg, E., & Ringdén, O. (2003). HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Experimental hematology*, 31(10), 890-896.

- Majumdar, M. K., Keane-Moore, M., Buyaner, D., Hardy, W. B., Moorman, M. A., McIntosh, K. R., & Mosca, J. D. (2003). Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *Journal of biomedical science*, 10(2), 228-241.
- Meisel, R., Zibert, A., Laryea, M., Göbel, U., Däubener, W., & Dilloo, D. (2004). Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2, 3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood*, 103(12), 4619-4621.
- Mellor, A. L., & Munn, D. H. (1999). Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: immunosuppression by starvation? *Immunology today*, 20(10), 469-473.
- Menard, C., Pacelli, L., Bassi, G., Dulong, J., Bifari, F., Bezier, I., . . . Bourin, P. (2013). Clinical-grade mesenchymal stromal cells produced under various good manufacturing practice processes differ in their immunomodulatory properties: standardization of immune quality controls. *Stem cells and development*, 22(12), 1789-1801.
- Morris Jr, S. M. (2002). Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. *Annual review of nutrition*, 22(1), 87-105.
- Munn, D. H., Shafizadeh, E., Attwood, J. T., Bondarev, I., Pashine, A., & Mellor, A. L. (1999). Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *The Journal of experimental medicine*, 189(9), 1363-1372.
- Nolan, R. P., & Lee, K. (2011). Dynamic model of CHO cell metabolism. *Metabolic Engineering*, 13(1), 108-124.
- Phinney, D. G., & Sensebé, L. (2013). Mesenchymal stromal cells: misconceptions and evolving concepts. *Cytotherapy*, 15(2), 140-145.
- Prasanna, S. J., Gopalakrishnan, D., Shankar, S. R., & Vasandan, A. B. (2010). Pro-inflammatory cytokines, IFN γ and TNF α , influence immune properties of human bone marrow and Wharton jelly mesenchymal stem cells differentially. *PloS one*, 5(2), e9016.
- Preinerstorfer, B., Schiesel, S., Lämmerhofer, M., & Lindner, W. (2010). Metabolic profiling of intracellular metabolites in fermentation broths from β -lactam antibiotics production by liquid chromatography–tandem mass spectrometry methods. *Journal of chromatography A*, 1217(3), 312-328.
- Rizzi, M., Baltes, M., Theobald, U., & Reuss, M. (1997). In vivo analysis of metabolic dynamics in *Saccharomyces cerevisiae*: II. mathematical model. *Biotechnology and bioengineering*, 55(4), 592-608.
- Robitaille, J., Chen, J., & Jolicoeur, M. (2015). A Single Dynamic Metabolic Model Can Describe mAb Producing CHO Cell Batch and Fed-Batch Cultures on Different Culture Media. *PloS one*, 10(9), e0136815.
- Rodriguez, P. C., Quiceno, D. G., & Ochoa, A. C. (2007). L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression. *Blood*, 109(4), 1568-1573.
- Sato, K., Ozaki, K., Oh, I., Meguro, A., Hatanaka, K., Nagai, T., . . . Ozawa, K. (2007). Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood*, 109(1), 228-234.

- Serafini, P., Borrello, I., & Bronte, V. (2006). *Myeloid suppressor cells in cancer: recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression*. Paper presented at the Seminars in cancer biology.
- Sheikh, K., Förster, J., & Nielsen, L. K. (2005). Modeling hybridoma cell metabolism using a generic genome-scale metabolic model of *Mus musculus*. *Biotechnology progress*, 21(1), 112-121.
- Steinman, L. (1996). Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. *Cell*, 85(3), 299-302.
- Templeton, N., Dean, J., Reddy, P., & Young, J. D. (2013). Peak antibody production is associated with increased oxidative metabolism in an industrially relevant fed-batch CHO cell culture. *Biotechnology and bioengineering*, 110(7).
- Wang, S., Qu, X., & Zhao, R. C. (2012). Clinical applications of mesenchymal stem cells. *Journal of hematology & oncology*, 5(1), 1.
- Weiss, M. L., Anderson, C., Medicetty, S., Seshareddy, K. B., Weiss, R. J., VanderWerff, I., . . . McIntosh, K. R. (2008). Immune properties of human umbilical cord Wharton's jelly-derived cells. *Stem cells*, 26(11), 2865-2874.
- William, T. T., Pendleton, J. D., Beyer, W. M., Egalka, M. C., & Guinan, E. C. (2003). Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*, 75(3), 389-397.
- Zhou, C., Yang, B., Tian, Y., Jiao, H., Zheng, W., Wang, J., & Guan, F. (2011). Immunomodulatory effect of human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells on lymphocytes. *Cellular immunology*, 272(1), 33-38.

3.11 Supplementary Materials

Table 3.3: Reaction equations

Reaction number	Reaction name	Reaction
1	AAtoSUC	$\text{ELYS} + \text{EILE} + \text{ELEU} + \text{EVAL} + \text{ETYR} + 7 \text{ AKG} + \text{ATP} + 9 \text{ NAD} + 2 \text{ NADP} \rightarrow 4 \text{ GLU} + 3 \text{ SUC} + \text{MAL} + 8 \text{ ACCOA} + \text{ADP} + 9 \text{ NADH} + 2 \text{ NADPH}$
2	AK	$\text{ATP} + \text{AMP} \rightarrow 2 \text{ ADP}$
3	AKGDH	$\text{AKG} + \text{NAD} \rightarrow \text{SCOA} + \text{NADH}$
4	ALATA	$\text{GLU} + \text{PYR} \rightleftharpoons \text{AKG} + \text{EALA}$
5	ARG1	$\text{ARG} \rightarrow \text{UREA} + \text{ORN}$
6	ARGt	$\text{EARG} + \text{ATP} \rightarrow \text{ARG} + \text{ADP}$
7	ASL	$\text{AS} \rightarrow \text{FUM} + \text{ARG}$
8	ASN	$\text{ASN} = \text{ASP} + \text{NH}_4$
9	ASNt	$\text{EASN} + \text{ATP} \rightarrow \text{ASN} + \text{ADP}$
10	ASPt	$\text{EASP} + \text{ATP} \rightarrow \text{ASP} + \text{ADP}$
11	ASS	$\text{CTR} + \text{ASP} + \text{ATP} \rightarrow \text{AS} + \text{AMP}$
12	ASTA	$\text{ASP} + \text{AKG} = \text{OXA} + \text{GLU}$
13	ATPase	$\text{ATP} \rightarrow \text{ADP}$
14	CITS	$\text{CIT} + \text{NAD} \rightarrow \text{AKG} + \text{NADH}$
15	CK	$\text{ADP} + \text{PCr} \rightleftharpoons \text{ATP} + \text{Cr}$
16	CS	$\text{ACCOA} + \text{OXA} \rightarrow \text{CIT}$
17	FUM	$\text{FUM} \rightarrow \text{MAL}$
18	G6PDH	$\text{G6P} + 2 \text{ NADP} \rightarrow \text{R5P} + 2 \text{ NADPH}$
19	GLDH	$\text{GLU} + \text{NAD} \rightleftharpoons \text{AKG} + \text{NADH} + \text{NH}_4$
20	GLN	$\text{GLN} \rightleftharpoons \text{NH}_4 + \text{GLU}$
21	GLNt	$\text{EGLN} + \text{ATP} \rightarrow \text{GLN} + \text{ADP}$

Table 3.3: Reaction equations (continue)

Reaction number	Reaction name	Reaction
22	GLUt	$\text{GLU} + \text{ADP} \rightarrow \text{EGLU} + \text{ATP}$
23	GLYt	$\text{EGLY} + \text{ATP} \rightarrow \text{GLY} + \text{ADP}$
24	growth	$0.06 \text{ EALA} + 0.04 \text{ EARG} + 0.03 \text{ EASN} + 0.04 \text{ EASP} + 0.02 \text{ ECYS} + 0.03 \text{ EGLN} + 0.04 \text{ EGLU} + 0.06 \text{ EGLY} + 0.02 \text{ EHis} + 0.03 \text{ EILE} + 0.06 \text{ ELEU} + 0.06 \text{ ELYS} + 0.01 \text{ EMET} + 0.02 \text{ EPHE} + 0.03 \text{ EPRO} + 0.05 \text{ ESER} + 0.04 \text{ ETHR} + 0.005 \text{ ETRP} + 0.02 \text{ ETYR} + 0.04 \text{ EVAL} + 3.78 \text{ ATP} + 0.03 \text{ G6P} + 0.03 \text{ R5P} + 0.09 \text{ CIT} \rightarrow \text{X} + 3.78 \text{ ADP}$
25	HISARGTA	$\text{EHis} + \text{EARG} + \text{AKG} \rightarrow 4 \text{ GLU} + \text{NH}_4$
26	HK	$\text{EGLC} + \text{ATP} \rightarrow \text{G6P} + \text{ADP}$
27	IDO	$\text{ETRP} \rightarrow \text{KYN}$
28	NOS	$\text{ARG} + \text{NADP} \rightarrow \text{CTR} + \text{NADPH} + \text{NO}$
29	KOT	$\text{KYN} + \text{AKG} \rightarrow \text{KYT} + \text{GLU}$
30	LDH	$\text{PYR} + \text{NADH} \rightarrow \text{ELAC} + \text{NAD}$
31	leak	$2 \text{ NADH} \rightarrow 2 \text{ NAD}$
32	ME	$\text{MAL} + \text{NAD} \rightarrow \text{PYR} + \text{NADH}$
33	MLD	$\text{MAL} + \text{NAD} \rightarrow \text{OXA} + \text{NADH}$
34	NADPHox	$\text{NADPH} \rightarrow \text{NADP}$
35	NAT	$2 \text{ R5P} + 2 \text{ ATP} + \text{GLN} \rightarrow \text{NAD} + \text{AMP} + \text{GLU}$
36	NHG	$\text{NAD} + \text{ATP} \rightarrow \text{NADP} + \text{ADP}$
37	OCT	$\text{ORN} \rightarrow \text{CTR}$
38	PC	$\text{PYR} + \text{ATP} \rightarrow \text{OXA} + \text{ADP}$
39	PDH	$\text{PYR} + \text{NAD} \rightarrow \text{ACCOA} + \text{NADH}$
40	PFK	$\text{F6P} + \text{ATP} \rightarrow 2 \text{ GAP} + \text{ADP}$
41	PGI	$\text{G6P} \rightleftharpoons \text{F6P}$

Table 3.3: Reaction equations (continue)

Reaction number	Reaction name	Reaction
42	PGK	$\text{GAP} + \text{ADP} + \text{NAD} \rightarrow \text{PEP} + \text{ATP} + \text{NADH}$
43	PK	$\text{PEP} + \text{ADP} \rightarrow \text{PYR} + \text{ATP}$
44	PPRibP	$\text{R5P} + 2 \text{ GLN} + \text{ASP} + \text{GLY} + 5 \text{ ATP} \rightarrow 2 \text{ GLU} + \text{FUM} + 4 \text{ ADP} + 2 \text{ AMP}$
45	resp	$2 \text{ NADH} + 4 \text{ ADP} \rightarrow 2 \text{ NAD} + 4 \text{ ATP}$
46	SCOAS	$\text{SCOA} + \text{ADP} \rightarrow \text{ATP} + \text{SUC}$
47	SDH	$\text{SUC} + 0.66 \text{ NAD} + \text{ADP} \rightarrow \text{FUM} + 0.66 \text{ NADH} + \text{ATP}$
48	SDHH	$\text{ESER} \rightarrow \text{PYR} + \text{NH}_4$
49	TK	$3 \text{ R5P} \rightarrow 2 \text{ F6P} + \text{GAP}$

Table 3.4: Successive steps for model calibration

Step number	Used metabolite	Determined reactions	Step number	Used metabolite	Determined reactions
1	X	growth	24	ASN	ASN
2	PCr	CK	25	ASP	ASTA
3	EGLC	HK	26	ACCOA	CS & PDH
4	ELAC	LDH	27	CIT	CITS
5	ETRP	IDO	28	AKG	AKGDH & GLD
6	KYN	KOT	29	SCOA	SCOAS
7	ELEU	AAtoSUC	30	SUC	SDH
8	EHIS	HISARGTA	31	NH4	GLN
9	EGLY	GLYt	32	FUM	FUM
10	UREA	ARG1	33	GLN	NAT
11	NO	NOS	34	AMP	AK
12	R5P	PPRibP	35	G6P	G6PDH & PGI
13	R5P	NAT.	36	NADPH	NADPHox
14	EARG	ARGt	37	NADP	NHG
15	EGLU	GLUt	38	F6P	PFK & TK
16	EGLN	GLNt	39	GAP	PGK
17	EALA	ALATA	40	PEP	PK
18	ESER	SDHH	41	R5P	EP
19	EASN	ASNt	42	MAL	ME & MLD
20	EASP	ASPt	43	OXA	PC
21	ORN	OCT	44	ADP	ATPase & resp
22	CTR	ASS	45	NAD	leak
23	AS.ARG	ASL			

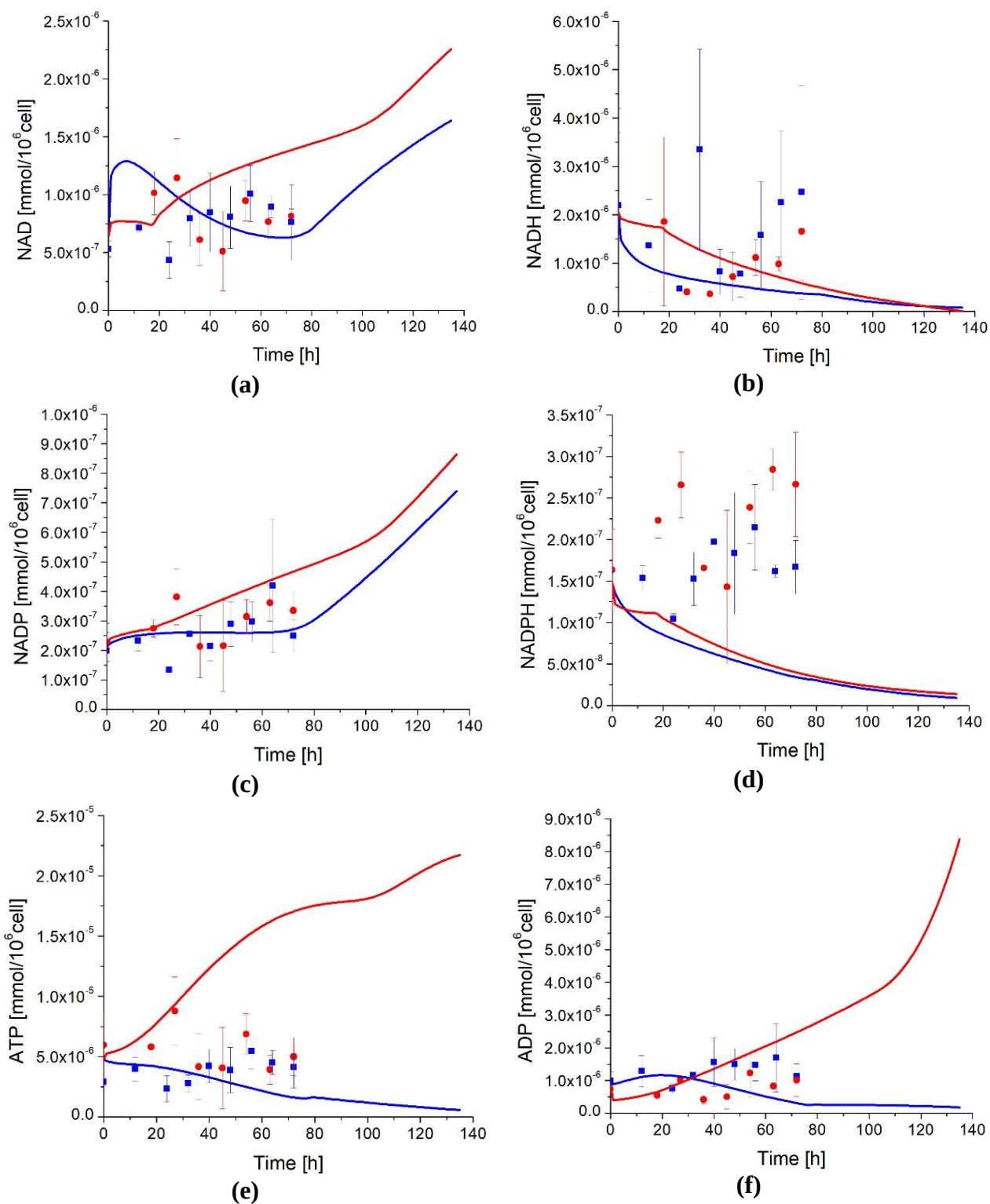


Figure 3.20: Experimental data and model simulation of cofactors and nucleotides concentrations.

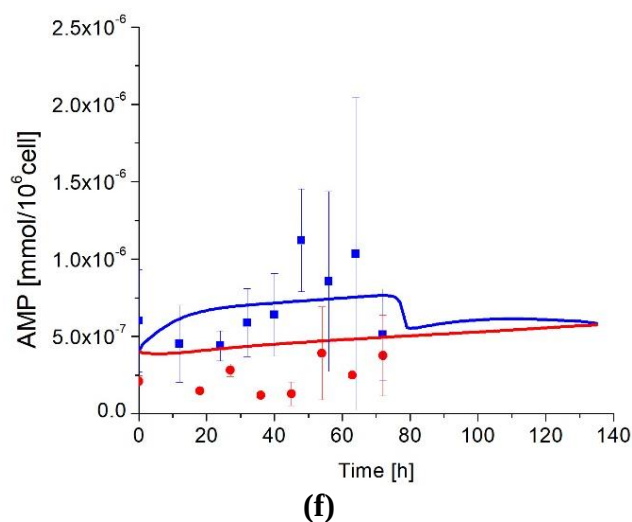


Figure 3.20: Experimental data and model simulation of cofactors and nucleotides concentrations.
(continue)

(a) Nicotinamide adenine dinucleotide concentration; (b) Nicotinamide adenine dinucleotide H concentration; (c) Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate concentration; (d) Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate H concentration; (e) Adenosine triphosphate concentration; (f) Adenosine diphosphate concentration; (g) Adenosine monophosphate concentration. ■ are P4 cells experimental data, ● are P9 cells experimental. Data Average values are shown for both passages (n=3). Blue line is P4 cells simulation, red line is P9 cells simulation.

Table 3.5: Initial values of metabolites

Metabolites	Metabolites name	Initial value	Unity
ACCOA	Acetyl-coenzyme-A	1,54E-08	mmol.10 ⁻⁶ cells
ADP	Adenosine diphosphate	8,59E-07	mmol.10 ⁻⁶ cells
AKG	α -ketoglutarate	8,61E-08	mmol.10 ⁻⁶ cells
AMP	Adenosine monophosphate	4,05E-07	mmol.10 ⁻⁶ cells
ARG	L-Arginine	1,40E-03	mmol.10 ⁻⁶ cells
AS	Arginosuccinate	1,00E-08	mmol.10 ⁻⁶ cells
ASN	Asparagine	6,45E-04	mmol.10 ⁻⁶ cells
ASP	Aspartate	3,83E-04	mmol.10 ⁻⁶ cells
ATP	Adenosine triphosphate	4,74E-06	mmol.10 ⁻⁶ cells
CIT	Citrate	2,00E-07	mmol.10 ⁻⁶ cells
Cr	Creatine	6,36E-03	mM
CTR	Citrulline	1,89E-02	mM
EALA	Extracellular Alanine	2,19E-01	mM
EARG	Extracellular L-Arginine	5,22E-01	mM
EASN	Extracellular Asparagine	2,05E-01	mM
EASP	Extracellular Aspartate	5,34E-01	mM
ECYS	Extracellular Cysteine	7,73E-02	mM
EGLC	Extracellular Glucose	7,14E+00	mM
EGLN	Extracellular Glutamine	3,56E+00	mM
EGLU	Extracellular Glutamate	5,86E-01	mM
EGLY	Extracellular Glycine	2,27E-01	mM
EHIS	Extracellular Histidine	1,55E-01	mM
EILE	Extracellular Isoleucine	3,02E-01	mM
ELAC	Extracellular Lactate	4,24E+00	mM
ELEU	Extracellular Leucine	3,20E-01	mM
ELYS	Extracellular Lysine	3,21E-01	mM

Table 3.5: Initial values of metabolites (continue)

Metabolites	Metabolites name	Initial value	Unity
EMET	Extracellular Methionine	9,49E-02	mM
EPHE	Extracellular Phenylalanine	2,54E-01	mM
EPRO	Extracellular Proline	2,02E-01	mM
ESER	Extracellular Serine	1,42E-01	mM
ETHR	Extracellular Threonine	2,17E-01	mM
ETRP	Extracellular Tryptophan	5,28E-02	mM
ETYR	Extracellular Tyrosine	1,78E-01	mM
EVAL	Extracellular Valine	5,58E-01	mM
F6P	Fructose-6-phosphate	1,00E-07	mmol.10 ⁻⁶ cells
FUM	Fumarate	2,61E-07	mmol.10 ⁻⁶ cells
G6P	Glucose-6-phosphate	1,00E-08	mmol.10 ⁻⁶ cells
GAP	Glyceraldehyde-3-phosphate	4,00E-08	mmol.10 ⁻⁶ cells
GLN	Glutamine	4,00E-03	mmol.10 ⁻⁶ cells
GLU	Glutamate	5,63E-04	mmol.10 ⁻⁶ cells
GLY	Glycine	1,00E-03	mmol.10 ⁻⁶ cells
KYN	Extracellular Kynurenine	1,00E-02	mM
KYT	Extracellular Kynurenine products	1,00E-02	mM
MAL	Malate	1,15E-06	mmol.10 ⁻⁶ cells
NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide	6,36E-07	mmol.10 ⁻⁶ cells
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide (reduced)	2,05E-06	mmol.10 ⁻⁶ cells
NADP	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	2,12E-07	mmol.10 ⁻⁶ cells
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced)	1,47E-07	mmol.10 ⁻⁶ cells
NH4	Extracellular Ammonia	1,29E-01	mM
NO	Nitric Oxide	8,83E-03	mM

Table 3.5: Initial values of metabolites (continue)

Metabolites	Metabolites name	Initial value	Unity
ORN	Ornithine	8,30E-02	mM
OXA	Oxaloacetate	1,50E-08	mmol.10 ⁻⁶ cells
PCr	Phosphocreatine	2,16E-06	mmol.10 ⁻⁶ cells
PEP	Phosphoenolpyruvate	1,42E-07	mmol.10 ⁻⁶ cells
PYR	Pyruvate	1,86E-07	mmol.10 ⁻⁶ cells
R5P	Ribose-5-phosphate	1,02E-07	mmol.10 ⁻⁶ cells
SCOA	Succinyl-coenzyme-A	4,00E-07	mmol.10 ⁻⁶ cells
SUC	Succinate	3,43E-07	mmol.10 ⁻⁶ cells
UREA	Urea	1,01E+00	mM
X	Cell density	3,75E-02	10 ⁶ cells.mL ⁻¹

Table 3.6: Parameter values for average simulation

Parameters	Values	Units	Parameters	Values	Units
$vmax_{AtoSUC}$	6,20E-04	mmol.10 ⁻⁶ cells.h ⁻¹	$km_{growth_{EPHE}}$	1,60E-02	mM
$vmax_{AK}$	1,92E-04	mmol.10 ⁻⁶ cells.h ⁻¹	$km_{growth_{EPRO}}$	1,00E-02	mM
$vmax_{AKGDH}$	1,53E-03	mmol.10 ⁻⁶ cells.h ⁻¹	$km_{growth_{ESER}}$	1,10E-03	mM
$vmax_{ALATA}$	1,09E-04	mmol.10 ⁻⁶ cells.h ⁻¹	$km_{growth_{ETHR}}$	9,60E-03	mM
$vmax_{ARG1}$	1,88E-04	mmol.10 ⁻⁶ cells.h ⁻¹	$Km_{growth_{ETYP}}$	1,20E-02	mM
$vmax_{ARGt}$	5,15E-05	mmol.10 ⁻⁶ cells.h ⁻¹	$km_{growth_{EVAL}}$	1,30E-02	mM
$vmax_{ASL}$	1,33E-04	mmol.10 ⁻⁶ cells.h ⁻¹	$km_{growth_{G6P}}$	9,90E-13	mmol.10 ⁻⁶ cells
$vmax_{ASN}$	5,00E-06	mmol.10 ⁻⁶ cells.h ⁻¹	$km_{growth_{R5P}}$	5,82E-12	mmol.10 ⁻⁶ cells
$vmax_{ASNt}$	5,47E-06	mmol.10 ⁻⁶ cells.h ⁻¹	$km_{HISARGTA_{AKG}}$	5,49E-06	mmol.10 ⁻⁶ cells
$vmax_{ASPt}$	9,29E-12	mmol.10 ⁻⁶ cells.h ⁻¹	$km_{HISARGTA_{EARG}}$	4,00E-01	mM
$vmax_{ASS}$	1,20E-03	mmol.10 ⁻⁶ cells.h ⁻¹	$km_{HISARGTA_{EHIS}}$	1,50E-01	mM
$vmax_{ASTA}$	8,90E-07	mmol.10 ⁻⁶ cells.h ⁻¹	$km_{HK_{ATP}}$	6,00E-05	/
$vmax_{ATPase}$	6,64E-03	mmol.10 ⁻⁶ cells.h ⁻¹	km_{HKEGLC}	5,00E+00	mM
$vmax_{CITS}$	1,08E-03	mmol.10 ⁻⁶ cells.h ⁻¹	$ki_{HK_{G6P}}$	1,00E-07	mmol.10 ⁻⁶ cells
$vmax_{CK}$	2,04E-06	mmol.10 ⁻⁶ cells.h ⁻¹	$ka_{HK_{AMP_{ATP}}}$	1,00E-02	/
$vmax_{CS}$	1,08E-03	mmol.10 ⁻⁶ cells.h ⁻¹	$alpha_{HK_{AMP_{ATP}}}$	1,10E+00	/
$vmax_{FUM}$	1,43E-03	mmol.10 ⁻⁶ cells.h ⁻¹	$beta_{HK_{AMP_{ATP}}}$	1,05E+00	/

Table 3.6: Parameter values for average simulation (continue)

Parameters	Values	Units	Parameters	Values	Units
$vmax_{G6PDH}$	5,00E-05	mmol.10 ⁻⁶ cells.h ⁻¹	$km_{IDO_{ETRP}}$	1,00E-02	mM
$vmax_{GLDH}$	6,25E-08	mmol.10 ⁻⁶ cells.h ⁻¹	$km_{iNOS_{ARG}}$	1,00E-03	mmol.10 ⁻⁶ cells
$vmax_{GLN}$	1,07E-01	mmol.10 ⁻⁶ cells.h ⁻¹	$km_{iNOS_{NADP}}$	3,00E-07	/
$vmax_{GLNt}$	2,28E-04	mmol.10 ⁻⁶ cells.h ⁻¹	$km_{KOT_{KYN}}$	1,00E-02	mM
$vmax_{GLUt}$	3,15E-05	mmol.10 ⁻⁶ cells.h ⁻¹	$km_{KOT_{AKG}}$	1,00E-07	mmol.10 ⁻⁶ cells
$vmax_{GLYt}$	1,59E-06	mmol.10 ⁻⁶ cells.h ⁻¹	$km_{LDH_{NADH}}$	1,01E-07	/
$vmax_{growth}$	6,97E-02	h ⁻¹	$km_{LDH_{PYR}}$	1,08E-07	mmol.10 ⁻⁶ cells
$vmax_{HISARGTA}$	1,90E-05	mmol.10 ⁻⁶ cells.h ⁻¹	$ki_{LDH_{PYR}}$	4,50E-07	mmol.10 ⁻⁶ cells
$vmax_{HK}$	1,00E-03	mmol.10 ⁻⁶ cells.h ⁻¹	$ka_{LDH_{AMP_{ATP}}}$	9,00E-02	/
$vmax_{IDO}$	1,35E-05	mmol.10 ⁻⁶ cells.h ⁻¹	$alpha_{LDH_{AMP_{ATP}}}$	4,65E-01	/
$vmax_{iNOS}$	1,21E-06	mmol.10 ⁻⁶ cells.h ⁻¹	$beta_{LDH_{AMP_{ATP}}}$	1,20E+01	/
$vmax_{KOT}$	1,11E-05	mmol.10 ⁻⁶ cells.h ⁻¹	$km_{leak_{NADH}}$	1,00E-06	/
$vmax_{LDH}$	8,80E-05	mmol.10 ⁻⁶ cells.h ⁻¹	$km_{ME_{NAD}}$	1,00E-06	/
$vmax_{leak}$	2,39E-03	mmol.10 ⁻⁶ cells.h ⁻¹	$km_{ME_{MAL}}$	1,00E-06	mmol.10 ⁻⁶ cells
$vmax_{ME}$	1,00E-06	mmol.10 ⁻⁶ cells.h ⁻¹	$km_{MLD_{MAL}}$	1,00E-06	mmol.10 ⁻⁶ cells
$vmax_{MLD}$	1,53E-03	mmol.10 ⁻⁶ cells.h ⁻¹	$km_{MLD_{NAD}}$	1,00E-06	/
$vmax_{NADPHox}$	5,33E-05	mmol.10 ⁻⁶ cells.h ⁻¹	$km_{NADPHox_{NADPH}}$	1,00E-07	/

Table 3.6: Parameter values for average simulation (continue)

Parameters	Values	Units	Parameters	Values	Units
$vmax_{NAT}$	5,00E-08	mmol.10 ⁻⁶ cells.h ⁻¹	$km_{NAT_{R5P}}$	1,00E-10	mmol.10 ⁻⁶ cells
$vmax_{NHG}$	1,40E-08	mmol.10 ⁻⁶ cells.h ⁻¹	$km_{NAT_{ATP}}$	5,00E-06	/
$vmax_{OCT}$	1,42E-04	mmol.10 ⁻⁶ cells.h ⁻¹	$km_{NAT_{GLN}}$	4,00E-03	mmol.10 ⁻⁶ cells
$vmax_{PC}$	7,90E-07	mmol.10 ⁻⁶ cells.h ⁻¹	$km_{NHG_{NAD}}$	1,00E-06	mmol.10 ⁻⁶ cells
$vmax_{PDH}$	1,17E-03	mmol.10 ⁻⁶ cells.h ⁻¹	$km_{NHG_{ATP}}$	5,00E-06	/
$vmax_{PFK}$	2,12E-04	mmol.10 ⁻⁶ cells.h ⁻¹	$km_{OCT_{ORN}}$	5,01E-02	mmol.10 ⁻⁶ cells
$vmax_{PGI}$	9,73E-02	mmol.10 ⁻⁶ cells.h ⁻¹	$km_{PC_{ATP}}$	5,00E-06	/
$vmax_{PGK}$	2,80E-02	mmol.10 ⁻⁶ cells.h ⁻¹	$km_{PC_{PYR}}$	1,00E-07	mmol.10 ⁻⁶ cells
$vmax_{PK}$	9,51E-04	mmol.10 ⁻⁶ cells.h ⁻¹	$km_{PDH_{NAD}}$	1,00E-08	/
$vmax_{PPRibP}$	2,40E+01	mmol.10 ⁻⁶ cells.h ⁻¹	$km_{PDH_{PYR}}$	2,00E-07	mmol.10 ⁻⁶ cells
$vmax_{resp}$	7,20E-04	mmol.10 ⁻⁶ cells.h ⁻¹	$km_{PFK_{ATP}}$	3,58E-09	/
$vmax_{SCOAS}$	1,42E-03	mmol.10 ⁻⁶ cells.h ⁻¹	$km_{PFK_{F6P}}$	3,00E-07	mmol.10 ⁻⁶ cells
$vmax_{SDH}$	1,39E-03	mmol.10 ⁻⁶ cells.h ⁻¹	$ka_{PFK_{AMP_{ATP}}}$	9,00E-02	/
$vmax_{SDHH}$	1,21E-05	mmol.10 ⁻⁶ cells.h ⁻¹	$alpha_{PFK_{AMP_{ATP}}}$	4,70E-01	/
$vmax_{TK}$	1,98E-06	mmol.10 ⁻⁶ cells.h ⁻¹	$beta_{PFK_{AMP_{ATP}}}$	1,05E+01	/
$vmax_{r_{AK}}$	1,93E-05	mmol.10 ⁻⁶ cells.h ⁻¹	$km_{PGI_{F6P}}$	2,01E-05	mmol.10 ⁻⁶ cells
$vmax_{r_{ASTA}}$	3,16E-04	mmol.10 ⁻⁶ cells.h ⁻¹	$km_{PGI_{G6P}}$	1,32E-06	mmol.10 ⁻⁶ cells

Table 3.6: Parameter values for average simulation (continue)

Parameters	Values	Units	Parameters	Values	Units
$vmaxr_{ASN}$	1,00E-08	mmol.10 ⁻⁶ cells.h ⁻¹	$ki_{PGI_{PEP}}$	3,70E-07	mmol.10 ⁻⁶ cells
$vmaxr_{CK}$	1,97E-06	mmol.10 ⁻⁶ cells.h ⁻¹	$km_{PGK_{ADP}}$	2,51E-08	/
$vmaxr_{PGI}$	1,97E-06	mmol.10 ⁻⁶ cells.h ⁻¹	$km_{PGK_{GAP}}$	1,02E-06	mmol.10 ⁻⁶ cells
$vmaxr_{ALATA}$	6,07E-05	mmol.10 ⁻⁶ cells.h ⁻¹	$km_{PGK_{NAD}}$	2,21E-08	/
$vmaxr_{GLN}$	1,79E-01	mmol.10 ⁻⁶ cells.h ⁻¹	$km_{PK_{ADP}}$	1,47E-04	/
$vmaxr_{GLDH}$	5,22E-05	mmol.10 ⁻⁶ cells.h ⁻¹	$km_{PK_{PEP}}$	7,92E-08	mmol.10 ⁻⁶ cells
$v_{growth_{ATP}}$	1,19E-02	mmol.10 ⁻⁶ cells	$ka_{PK_{F6P}}$	2,09E-08	mmol.10 ⁻⁶ cells
$v_{growth_{ADP}}$	1,19E-02	mmol.10 ⁻⁶ cells	$alpha_{PK_{F6P}}$	9,89E-01	mmol.10 ⁻⁶ cells
$v_{growth_{CIT}}$	2,73E-04	mmol.10 ⁻⁶ cells	$beta_{PK_{F6P}}$	1,89E+00	mmol.10 ⁻⁶ cells
$v_{growth_{EALA}}$	1,89E-04	mmol.10 ⁻⁶ cells	$km_{PPRibP_{ASP}}$	5,00E-01	mmol.10 ⁻⁶ cells
$v_{growth_{EARG}}$	1,19E-04	mmol.10 ⁻⁶ cells	$km_{PPRibP_{ATP}}$	5,00E-06	/
$v_{growth_{EASN}}$	9,07E-05	mmol.10 ⁻⁶ cells	$km_{PPRibP_{GLN}}$	3,00E+00	mmol.10 ⁻⁶ cells
$v_{growth_{EASP}}$	1,13E-04	mmol.10 ⁻⁶ cells	$km_{PPRibP_{GLY}}$	2,00E-01	mmol.10 ⁻⁶ cells
$v_{growth_{ECYS}}$	4,57E-05	mmol.10 ⁻⁶ cells	$km_{PPRibP_{R5P}}$	1,00E-11	mmol.10 ⁻⁶ cells
$v_{growth_{EGLN}}$	1,01E-04	mmol.10 ⁻⁶ cells	$km_{resp_{ADP}}$	1,00E-06	mmol.10 ⁻⁶ cells
$v_{growth_{EGLU}}$	1,22E-04	mmol.10 ⁻⁶ cells	$km_{resp_{NADH}}$	2,00E-06	/
$v_{growth_{EGLY}}$	1,69E-04	mmol.10 ⁻⁶ cells	$km_{SCOAS_{ADP}}$	1,00E-06	/

Table 3.6: Parameter values for average simulation (continue)

Parameters	Values	Units	Parameters	Values	Units
$v_{growth_{EHIS}}$	4,50E-05	mmol.10 ⁻⁶ cells	$km_{SCOAS_{SCOA}}$	4,00E-07	mmol.10 ⁻⁶ cells
$v_{growth_{EILE}}$	1,02E-04	mmol.10 ⁻⁶ cells	$km_{SDH_{ADP}}$	1,00E-06	/
$v_{growth_{ELEU}}$	1,78E-04	mmol.10 ⁻⁶ cells	$km_{SDH_{NAD}}$	1,00E-06	mM
$v_{growth_{ELYS}}$	1,80E-04	mmol.10 ⁻⁶ cells	$km_{SDH_{SUC}}$	3,00E-07	mmol.10 ⁻⁶ cells
$v_{growth_{EMET}}$	4,35E-05	mmol.10 ⁻⁶ cells	$km_{SDHH_{ESER}}$	1,00E-01	mM
$v_{growth_{EPHE}}$	6,90E-05	mmol.10 ⁻⁶ cells	$km_{TK_{R5P}}$	1,09E-07	mmol.10 ⁻⁶ cells
$v_{growth_{EPRO}}$	9,86E-05	mmol.10 ⁻⁶ cells			
$v_{growth_{ESER}}$	1,35E-04	mmol.10 ⁻⁶ cells			
$v_{growth_{ETHR}}$	1,22E-04	mmol.10 ⁻⁶ cells			
$v_{growth_{ETRP}}$	1,39E-05	mmol.10 ⁻⁶ cells			
$v_{growth_{ETYR}}$	5,73E-05	mmol.10 ⁻⁶ cells			
$v_{growth_{EVAL}}$	1,31E-04	mmol.10 ⁻⁶ cells			
$v_{growth_{G6P}}$	8,79E-05	mmol.10 ⁻⁶ cells			
$v_{growth_{R5P}}$	7,34E-05	mM			

Table 3.7: MRM transition and retention time of each amino acid

Compound name	IS	Precursor ion	MS1 res	Product ion	MS2 res	Dwell	frag	CE	polarity	RT min
Cystine	NO	241.3	wide	241	unit	100	76	0	pos	14.78
homoarginine	YES	189.2	wide	144	unit	100	92	12	pos	14.44
tyrosine	NO	182.2	wide	136.1	unit	100	66	8	pos	8.74
homophenylalanine	YES	180.2	wide	134.1	unit	100	75	8	pos	6.12
arginine	NO	175.2	wide	70.1	unit	100	95	24	pos	15.09
phenylalanine	NO	166.2	wide	120.1	unit	100	72	8	pos	6.92
histidine	NO	156.2	wide	110.1	unit	100	81	12	pos	16.84
Methionine-d3	YES	153.2	wide	136.1	unit	100	69	4	pos	8.22
methionine	NO	150.2	wide	133	unit	100	63	4	pos	8.18
Glutamic acid	NO	148.1	wide	84.1	unit	100	72	16	pos	12.59
lysine	NO	147.2	wide	84.1	unit	100	66	12	pos	15.48
glutamine	NO	147.2	wide	84.1	unit	100	72	16	pos	11.3
Aspartic acid	NO	134.1	wide	74.1	unit	100	61	12	pos	14.23

Table 3.7: MRM transition and retention time of each amino acid (continue)

Compound name	IS	Precursor ion	MS1 res	Product ion	MS2 res	Dwell	frag	CE	polarity	RT min
asparagine	NO	133.1	wide	74	unit	100	60	12	pos	11.87
isoleucine	NO	132.2	wide	86.1	unit	100	63	4	pos	7.431
leucine	NO	132.2	wide	86.1	unit	100	72	4	pos	7.431
threonine	NO	120.1	wide	103.1	unit	100	133	16	pos	6.94
valine	NO	118.2	wide	72.1	unit	100	55	8	pos	9
proline	NO	116.1	wide	70.1	unit	100	75	12	pos	9.6
serine	NO	106.1	wide	60.1	unit	100	60	8	pos	11.62
alanine	NO	90.1	wide	44.1	unit	100	42	8	pos	10.7
glycine	NO	76.1	wide	30.1	unit	100	39	4	pos	11.47

Table 3.8: Flux equations

Number	Equation
1	$V_{AtoSUC} = v_{max_{AtoSUC}} \cdot \frac{[AKG]}{[AKG] + km_{AtoSUC_{AKG}}} \cdot \frac{\frac{[ATP]}{[ADP]}}{\frac{[ATP]}{[ADP]} + km_{AtoSUC_{ATP}}} \cdot \frac{\frac{[NAD]}{[NADH]}}{\frac{[NAD]}{[NADH]} + km_{AtoSUC_{NAD}}} \cdot \frac{\frac{[NADP]}{[NADPH]}}{\frac{[NADP]}{[NADPH]} + km_{AtoSUC_{NADP}}} \cdot \frac{[EILE]}{[EILE] + km_{AtoSUC_{EILE}}} \cdot \frac{[EVAL]}{[EVAL] + km_{AtoSUC_{EVAL}}} \cdot \frac{[ELEU]}{[ELEU] + km_{AtoSUC_{ELEU}}} \cdot \frac{[ETRY]}{[ETRY] + km_{AtoSUC_{ETRY}}} \cdot \frac{[ELYS]}{[ELYS] + km_{AtoSUC_{ELYS}}}$
2	$V_{AK} = v_{max_{AK}} \cdot \frac{[AMP]}{[AMP] + km_{AK_{AMP}}} \cdot \frac{\frac{[ATP]}{[ADP]}}{\frac{[ATP]}{[ADP]} + km_{AK_{ATP}}} - v_{maxr_{AK}} \cdot \frac{\frac{[ADP]}{[ATP]}}{\frac{[ADP]}{[ATP]} + km_{AK_{ADP}}}$
3	$V_{AKGDH} = v_{max_{AKGDH}} \cdot \frac{[AKG]}{[AKG] + km_{AKGDH_{AKG}}} \cdot \frac{\frac{[NAD]}{[NADH]}}{\frac{[NAD]}{[NADH]} + km_{AKGDH_{NAD}}}$
4	$V_{ALATA} = v_{max_{ALATA}} \cdot \frac{[GLU]}{[GLU] + km_{ALATA_{GLU}}} \cdot \frac{[PYR]}{[PYR] + km_{ALATA_{PYR}}} - v_{maxr_{ALATA}} \cdot \frac{[AKG]}{[AKG] + km_{ALATA_{AKG}}} \cdot \frac{[EALA]}{[EALA] + km_{ALATA_{EALA}}}$
5	$V_{ARG1} = v_{max_{ARG1}} \cdot \frac{[ARG]}{[ARG] + km_{ARG1_{ARG}}}$

Table 3.8: Flux equations (continue)

Number	Equation
6	$V_{ARGt} = v_{max_{ARGt}} \cdot \frac{\frac{[ATP]}{[ADP]}}{\frac{[ATP]}{[ADP]} + km_{ARGt_{ATP}}} \cdot \frac{[EARG]}{[EARG] + km_{ARGt_{EARG}}}$
7	$V_{ASL} = v_{max_{ASL}} \cdot \frac{[AS]}{[AS] + km_{ASL_{AS}}}$
8	$V_{ASN} = v_{max_{ASN}} \cdot \frac{[ASN]}{[ASN] + km_{ASN_{ASN}}} - v_{maxr_{ASN}} \cdot \frac{[ASP]}{[ASP] + km_{ASN_{ASP}}} \cdot \frac{[NH4]}{[NH4] + km_{ASN_{NH4}}}$
9	$V_{ASNt} = v_{max_{ASNt}} \cdot \frac{\frac{[ATP]}{[ADP]}}{\frac{[ATP]}{[ADP]} + km_{ASNt_{ATP}}} \cdot \frac{[EASN]}{[EASN] + km_{ASNt_{EASN}}}$
10	$V_{ASPt} = v_{max_{ASPt}} \cdot \frac{\frac{[ATP]}{[ADP]}}{\frac{[ATP]}{[ADP]} + km_{ASPt_{ATP}}} \cdot \frac{[EASP]}{[EASP] + km_{ASPt_{EASP}}}$
11	$V_{ASS} = v_{max_{ASS}} \cdot \frac{[ASP]}{[ASP] + km_{ASS_{ASP}}} \cdot \frac{\frac{[ATP]}{[ADP]}}{\frac{[ATP]}{[ADP]} + km_{ASS_{ATP}}} \cdot \frac{[CTR]}{[CTR] + km_{ASS_{CTR}}}$

Table 3.8: Flux equations (continue)

Number	Equation
12	$V_{ASTA} = v_{max_{ASTA}} \cdot \frac{[AKG]}{[AKG] + km_{ASTA_{AKG}}} \cdot \frac{[ASP]}{[ASP] + km_{ASTA_{ASP}}} - v_{maxr_{ASTA}} \cdot \frac{[GLU]}{[GLU] + km_{ASTA_{GLU}}} \cdot \frac{[OXA]}{[OXA] + km_{ASTA_{OXA}}}$
13	$V_{ATPase} = v_{max_{ATPase}} \cdot \frac{[ATP]}{[ATP] + km_{ATPase_{ATP}}}$
14	$V_{CITS} = v_{max_{CITS}} \cdot \frac{[CIT]}{[CIT] + km_{CITS_{CIT}}} \cdot \frac{\frac{[NAD]}{[NADH]}}{\frac{[NAD]}{[NADH]} + km_{CITS_{NAD}}}$
15	$V_{CK} = v_{max_{CK}} \cdot \frac{\frac{[ADP]}{[ATP]}}{\frac{[ADP]}{[ATP]} + km_{CK_{ADP}}} \cdot \frac{[PCr]}{[PCr] + km_{CK_{PCr}}} - v_{maxr_{CK}} \cdot \frac{\frac{[ATP]}{[ADP]}}{\frac{[ATP]}{[ADP]} + km_{CK_{ATP}}} \cdot \frac{[Cr]}{[Cr] + km_{CK_{Cr}}}$
16	$V_{CS} = v_{max_{CS}} \cdot \frac{[ACCOA]}{[ACCOA] + km_{CS_{ACCOA}}} \cdot \frac{[OXA]}{[OXA] + km_{CS_{OXA}}}$
17	$V_{FUM} = v_{max_{FUM}} \cdot \frac{[FUM]}{[FUM] + km_{FUM_{FUM}}}$

Table 3.8: Flux equations (continue)

Number	Equation
18	$V_{G6PDH} = v_{max_{G6PDH}} \cdot \frac{[G6P]}{[G6P] + km_{G6PDH_{G6P}}} \cdot \frac{\frac{[NADP]}{[NADPH]}}{\frac{[NADP]}{[NADPH]} + km_{G6PDH_{NADP}}}$
19	$V_{GLDH} = v_{max_{GLDH}} \cdot \frac{[GLU]}{[GLU] + km_{GLDH_{GLU}}} \cdot \frac{\frac{[NAD]}{[NADH]}}{\frac{[NAD]}{[NADH]} + km_{GLDH_{NAD}}} - v_{maxr_{GLDH}} \cdot \frac{[AKG]}{[AKG] + km_{GLDH_{AKG}}} \cdot \frac{\frac{[NADH]}{[NAD]}}{\frac{[NADH]}{[NAD]} + km_{GLDH_{NADH}}} \cdot \frac{[NH4]}{[NH4] + km_{GLDH_{NH4}}}$
20	$V_{GLN} = v_{max_{GLN}} \cdot \frac{[GLN]}{[GLN] + km_{GLN_{GLN}}} - v_{maxr_{GLN}} \cdot \frac{[GLU]}{[GLU] + km_{GLN_{GLU}}} \cdot \frac{[NH4]}{[NH4] + km_{GLN_{NH4}}}$
21	$V_{GLNt} = v_{max_{GLNt}} \cdot \frac{\frac{[ATP]}{[ADP]}}{\frac{[ATP]}{[ADP]} + km_{GLNt_{ATP}}} \cdot \frac{[EGLN]}{[EGLN] + km_{GLNt_{EGLN}}}$
22	$V_{GLUt} = v_{max_{GLUt}} \cdot \frac{\frac{[ADP]}{[ATP]}}{\frac{[ADP]}{[ATP]} + km_{GLUt_{ADP}}} \cdot \frac{[GLU]}{[GLU] + km_{GLUt_{GLU}}}$

Table 3.8: Flux equations (continue)

Number	Equation
23	$V_{GLYt} = v_{max_{GLYt}} * \frac{\frac{[ATP]}{[ADP]}}{\frac{[ATP]}{[ADP]} + km_{GLYt_{ATP}}} * \frac{[EGLY]}{[EGLY] + km_{GLYt_{EGLY}}}$
24	$V_{growth} = v_{max_{growth}} * \frac{\frac{[ATP]}{[ADP]}}{\frac{[ATP]}{[ADP]} + km_{growth_{ATP}}} * \frac{[CIT]}{[CIT] + km_{growth_{CIT}}} * \frac{[G6P]}{[G6P] + km_{growth_{G6P}}}$ $* \frac{[R5P]}{[R5P] + km_{growth_{R5P}}} * \frac{[EARG]}{[EARG] + km_{growth_{EARG}}} * \frac{[ETRP]}{[ETRP] + km_{growth_{ETRP}}}$ $* \frac{[EGLU]}{[EGLU] + km_{growth_{EGLU}}} * \frac{[EGLN]}{[EGLN] + km_{growth_{EGLN}}} * \frac{[EALA]}{[EALA] + km_{growth_{EALA}}}$ $* \frac{[ESER]}{[ESER] + km_{growth_{ESER}}} * \frac{[EASN]}{[EASN] + km_{growth_{EASN}}} * \frac{[EASP]}{[EASP] + km_{growth_{EASP}}}$ $* \frac{[EILE]}{[EILE] + km_{growth_{EILE}}} * \frac{[EVAL]}{[EVAL] + km_{growth_{EVAL}}} * \frac{[ETHR]}{[ETHR] + km_{growth_{ETHR}}}$ $* \frac{[ELEU]}{[ELEU] + km_{growth_{ELEU}}} * \frac{[ETYR]}{[ETYR] + km_{growth_{ETYR}}} * \frac{[ECYS]}{[ECYS] + km_{growth_{ECYS}}}$ $* \frac{[ELYS]}{[ELYS] + km_{growth_{ELYS}}} * \frac{[EPRO]}{[EPRO] + km_{growth_{EPRO}}} * \frac{[EMET]}{[EMET] + km_{growth_{EMET}}}$ $* \frac{[EPHE]}{[EPHE] + km_{growth_{EPHE}}} * \frac{[EHIS]}{[EHIS] + km_{growth_{EHIS}}} * \frac{[EGLY]}{[EGLY] + km_{growth_{EGLY}}}$
25	$V_{HISARGTA} = v_{max_{HISARGTA}} * \frac{[AKG]}{[AKG] + km_{HISARGTA_{AKG}}} * \frac{[EARG]}{[EARG] + km_{HISARGTA_{EARG}}} * \frac{[EHIS]}{[EHIS] + km_{HISARGTA_{EHIS}}}$

Table 3.8: Flux equations (continue)

Number	Equation
26	$V_{HK} = v_{max_{HK}} * \frac{\frac{[ATP]}{[ADP]}}{\frac{[ATP]}{[ADP]} + km_{HK_{ATP}}} * \frac{[EGLC] * \left(1 + \frac{beta_{HK_{AMP_{ATP}}} * \frac{[AMP]}{[ATP]}}{alpha_{HK_{AMP_{ATP}}} * ka_{HK_{AMP_{ATP}}}} \right)}{km_{HK_{EGLC}} * \left(1 + \frac{[AMP]}{ka_{HK_{AMP_{ATP}}}} \right) + [EGLC] * \left(1 + \frac{[AMP]}{alpha_{HK_{AMP_{ATP}}} * ka_{HK_{AMP_{ATP}}}} \right)} * \frac{ki_{HK_{G6P}}}{ki_{HK_{G6P}} + [G6P]}$
27	$V_{IDO} = v_{max_{IDO}} * \frac{[ETRP]}{[ETRP] + km_{IDO_{ETRP}}}$
28	$V_{iNOS} = v_{max_{iNOS}} * \frac{[ARG]}{[ARG] + km_{iNOS_{ARG}}} * \frac{\frac{[NADP]}{[NADPH]}}{\frac{[NADP]}{[NADPH]} + km_{iNOS_{NADP}}}$
29	$V_{KOT} = v_{max_{KOT}} * \frac{[AKG]}{[AKG] + km_{KOT_{AKG}}} * \frac{[KYN]}{[KYN] + km_{KOT_{KYN}}}$

Table 3.8: Flux equations (continue)

Number	Equation
30	$V_{LDH} = v_{max_{LDH}} * \frac{\frac{[NADH]}{[NAD]}}{\frac{[NADH]}{[NAD]} + km_{LDH_{NADH}}} * \frac{[PYR] * \left(1 + \frac{beta_{LDH_{AMP_{ATP}}} * \frac{[AMP]}{[ATP]}}{alpha_{LDH_{AMP_{ATP}}} * ka_{LDH_{AMP_{ATP}}}} \right)}{km_{LDH_{PYR}} * \left(1 + \frac{\frac{[AMP]}{[ATP]}}{ka_{LDH_{AMP_{ATP}}}} \right) + [PYR] * \left(1 + \frac{\frac{[AMP]}{[ATP]}}{alpha_{LDH_{AMP_{ATP}}} * ka_{LDH_{AMP_{ATP}}}} \right)}$
31	$V_{leak} = v_{max_{leak}} * \frac{[NADH]}{[NADH] + km_{leak_{NADH}}}$
32	$V_{ME} = v_{max_{ME}} * \frac{[MAL]}{[MAL] + km_{ME_{MAL}}} * \frac{\frac{[NAD]}{[NADH]}}{\frac{[NAD]}{[NADH]} + km_{ME_{NAD}}}$
33	$V_{MLD} = v_{max_{MLD}} * \frac{[MAL]}{[MAL] + km_{MLD_{MAL}}} * \frac{\frac{[NAD]}{[NADH]}}{\frac{[NAD]}{[NADH]} + km_{MLD_{NAD}}}$
34	$V_{NADPHox} = v_{max_{NADPHox}} * \frac{[NADPH]}{[NADPH] + km_{NADPHox_{NADPH}}}$

Table 3.8: Flux equations (continue)

Number	Equation
35	$V_{NAT} = v_{max_{NAT}} * \frac{\frac{[ATP]}{[ADP]}}{\frac{[ATP]}{[ADP]} + km_{NAT_{ATP}}} * \frac{[GLN]}{[GLN] + km_{NAT_{GLN}}} * \frac{[R5P]}{[R5P] + km_{NAT_{R5P}}}$
36	$V_{NHG} = v_{max_{NHG}} * \frac{\frac{[ATP]}{[ADP]}}{\frac{[ATP]}{[ADP]} + km_{NHG_{ATP}}} * \frac{\frac{[NAD]}{[NADH]}}{\frac{[NAD]}{[NADH]} + km_{NHG_{NAD}}}$
37	$V_{OCT} = v_{max_{OCT}} * \frac{[ORN]}{[ORN] + km_{OCT_{ORN}}}$
38	$V_{PC} = v_{max_{PC}} * \frac{\frac{[ATP]}{[ADP]}}{\frac{[ATP]}{[ADP]} + km_{PC_{ATP}}} * \frac{[PYR]}{[PYR] + km_{PC_{PYR}}}$
39	$V_{PDH} = v_{max_{PDH}} * \frac{\frac{[NAD]}{[NADH]}}{\frac{[NAD]}{[NADH]} + km_{PDH_{NAD}}} * \frac{[PYR]}{[PYR] + km_{PDH_{PYR}}}$

Table 3.8: Flux equations (continue)

Number	Equation
40	$V_{PFK} = v_{max_{PFK}} * \frac{\frac{[ATP]}{[ADP]}}{\frac{[ATP]}{[ADP]} + km_{PFK_{ATP}}} * \frac{[F6P] * \left(1 + \frac{beta_{PFK_{AMP_{ATP}}} * \frac{[AMP]}{[ATP]}}{alpha_{PFK_{AMP_{ATP}}} * ka_{PFK_{AMP_{ATP}}}} \right)}{km_{PFK_{F6P}} * \left(1 + \frac{\frac{[AMP]}{[ATP]}}{ka_{PFK_{AMP_{ATP}}}} \right) + [F6P] * \left(1 + \frac{\frac{[AMP]}{[ATP]}}{alpha_{PFK_{AMP_{ATP}}} * ka_{PFK_{AMP_{ATP}}}} \right)}$
41	$V_{PGI} = v_{max_{PGI}} * \frac{[G6P]}{[G6P] + km_{PGI_{G6P}}} * \frac{ki_{PGI_{PEP}}}{ki_{PGI_{PEP}} + [PEP]} - v_{maxr_{PGI}} * \frac{[F6P]}{[F6P] + km_{PGI_{F6P}}}$
42	$V_{PGK} = v_{max_{PGK}} * \frac{\frac{[ADP]}{[ATP]}}{\frac{[ADP]}{[ATP]} + km_{PGK_{ADP}}} * \frac{[GAP]}{[GAP] + km_{PGK_{GAP}}} * \frac{\frac{[NAD]}{[NADH]}}{\frac{[NAD]}{[NADH]} + km_{PGK_{NAD}}}$
43	$V_{PK} = v_{max_{PK}} * \frac{\frac{[ADP]}{[ATP]}}{\frac{[ADP]}{[ATP]} + km_{PK_{ADP}}} * \frac{[PEP] * \left(1 + \frac{beta_{PK_{F6P}} * [F6P]}{alpha_{PK_{F6P}}} * ka_{PK_{F6P}} \right)}{km_{PK_{PEP}} * \left(1 + \frac{[F6P]}{ka_{PK_{F6P}}} \right) + [PEP] * \left(1 + \frac{[F6P]}{alpha_{PK_{F6P}}} * ka_{PK_{F6P}} \right)}$

Table 3.8: Flux equations (continue)

Number	Equation
44	$V_{PPRibP} = v_{max_{PPRibP}} * \frac{[ASP]}{[ASP] + km_{PPRibP_{ASP}}} * \frac{\frac{[ATP]}{[ADP]}}{\frac{[ATP]}{[ADP]} + km_{PPRibP_{ATP}}} * \frac{[GLN]}{[GLN] + km_{PPRibP_{GLN}}} * \frac{[GLY]}{[GLY] + km_{PPRibP_{GLY}}} * \frac{[R5P]}{[R5P] + km_{PPRibP_{R5P}}}$
45	$V_{resp} = v_{max_{resp}} * \frac{[ADP]}{[ADP] + km_{resp_{ADP}}} * \frac{[NADH]}{[NADH] + km_{resp_{NADH}}}$
46	$V_{SCOAS} = v_{max_{SCOAS}} * \frac{\frac{[ADP]}{[ATP]}}{\frac{[ADP]}{[ATP]} + km_{SCOAS_{ADP}}} * \frac{[SCOA]}{[SCOA] + km_{SCOAS_{SCOA}}}$
47	$V_{SDH} = v_{max_{SDH}} * \frac{\frac{[ADP]}{[ATP]}}{\frac{[ADP]}{[ATP]} + km_{SDH_{ADP}}} * \frac{\frac{[NAD]}{[NADH]}}{\frac{[NAD]}{[NADH]} + km_{SDH_{NAD}}} * \frac{[SUC]}{[SUC] + km_{SDH_{SUC}}}$
48	$V_{SDHH} = v_{max_{SDHH}} * \frac{[ESER]}{[ESER] + km_{SDHH_{ESER}}}$
49	$V_{TK} = v_{max_{TK}} * \frac{[R5P]}{[R5P] + km_{TK_{R5P}}}$

Table 3.9: Metabolite concentrations differential equations

Equation number	Metabolite equation
1	$\frac{d[ACCOA]}{dt} = (8 * V_{AAtoSUC}) - V_{CS} + V_{PDH} - (V_{growth} * [ACCOA])$
2	$\begin{aligned} \frac{d[ADP]}{dt} = & V_{AAtoSUC} + (2 * V_{AK}) + V_{ARGt} + V_{ASNt} + V_{ASPt} + V_{ATPase} - V_{CK} + V_{GLNt} - V_{GLUt} + V_{GLYt} + V_{HK} + V_{NHG} \\ & + V_{PC} + V_{PFK} - V_{PGK} - V_{PK} + (4 * V_{PPRibP}) - (4 * V_{resp}) - V_{SCOAS} - V_{SDH} - (V_{growth} * [ADP]) \\ & + (V_{growth_{ADP}} * V_{growth}) \end{aligned}$
3	$\begin{aligned} \frac{d[AKG]}{dt} = & -(7 * V_{AAtoSUC}) - V_{AKGDH} + V_{ALATA} - V_{ASTA} + V_{CITS} + V_{GLDH} - V_{HISARGTA} - V_{KOT} \\ & - (V_{growth} * [AKG]) \end{aligned}$
4	$\frac{d[AMP]}{dt} = -V_{AK} + V_{ASS} + V_{NAT} + (2 * V_{PPRibP}) - (V_{growth} * [AMP])$
5	$\frac{d[ARG]}{dt} = -V_{ARG1} + V_{ARGt} + V_{ASL} - V_{iNOS} - (V_{growth} * [ARG])$
6	$\frac{d[AS]}{dt} = -V_{ASL} + V_{ASS} - (V_{growth} * [AS])$
7	$\frac{d[ASN]}{dt} = -V_{ASN} + V_{ASNt} - (V_{growth} * [ASN])$

Table 3.9: Metabolite concentrations differential equations (continue)

Equation number	Metabolite equation
8	$\frac{d[ASP]}{dt} = V_{ASN} + V_{ASPt} - V_{ASS} - V_{ASTA} - V_{PPRibP} - (V_{growth} * [ASP])$
9	$\begin{aligned} \frac{d[ATP]}{dt} = & -V_{AAToSUC} - V_{AK} - V_{ARGt} - V_{ASNt} - V_{ASPt} - V_{ASS} - V_{ATPase} + V_{CK} - V_{GLNt} + V_{GLUt} - V_{GLYt} \\ & - V_{HK} - (2 * V_{NAT}) - V_{NHG} - V_{PC} - V_{PFK} + V_{PGK} + V_{PK} - (5 * V_{PPRibP}) + (4 * V_{resp}) \\ & + V_{SCOAS} + V_{SDH} - (V_{growth} * [ATP]) - (V_{growth_{ATP}} * V_{growth}) \end{aligned}$
10	$\frac{d[CIT]}{dt} = -V_{CITS} + V_{CS} - (V_{growth} * [CIT]) - (V_{growth_{CIT}} * V_{growth})$
11	$\frac{d[F6P]}{dt} = -V_{PFK} + V_{PGI} + (2 * V_{TK}) - (V_{growth} * [F6P])$
12	$\frac{d[FUM]}{dt} = V_{ASL} - V_{FUM} + V_{PPRibP} + V_{SDH} - (V_{growth} * [FUM])$
13	$\frac{d[G6P]}{dt} = -V_{G6PDH} + V_{HK} - V_{PGI} - (V_{growth} * [G6P]) - (V_{growth_{G6P}} * V_{growth})$
14	$\frac{d[GAP]}{dt} = (2 * V_{PFK}) - V_{PGK} + V_{TK} - (V_{growth} * [GAP])$
15	$\frac{d[GLN]}{dt} = -V_{GLN} + V_{GLNt} - V_{NAT} - (2 * V_{PPRibP}) - (V_{growth} * [GLN])$

Table 3.9: Metabolite concentrations differential equations (continue)

Equation number	Metabolite equation
16	$\frac{d[GLU]}{dt} = (4 * V_{AAtoSUC}) - V_{ALATA} + V_{ASTA} - V_{GLDH} + V_{GLN} - V_{GLUt} + (4 * V_{HISARGTA}) + V_{KOT} + V_{NAT}$ $+ (2 * V_{PPRibP}) - (V_{growth} * [GLU])$
17	$d \frac{[GLY]}{dt} = V_{GLYt} - V_{PPRibP} - (V_{growth} * [GLY])$
18	$\frac{d[MAL]}{dt} = V_{AAtoSUC} + V_{FUM} - V_{ME} - V_{MLD} - (V_{growth} * [MAL])$
19	$\frac{d[NAD]}{dt} = -(9 * V_{AAtoSUC}) - V_{AKGDH} - V_{CITS} - V_{GLDH} + V_{LDH} + (2 * V_{leak}) - V_{ME} - V_{MLD} + V_{NAT} - V_{NHG}$ $- V_{PDH} - V_{PGK} + (2 * V_{resp}) - (0.66 * V_{SDH}) - (V_{growth} * [NAD])$
20	$\frac{d[NADH]}{dt} = (9 * V_{AAtoSUC}) + V_{AKGDH} + V_{CITS} + V_{GLDH} - V_{LDH} - (2 * V_{leak}) + V_{ME} + V_{MLD} + V_{PDH} + V_{PGK}$ $- (2 * V_{resp}) + (0.66 * V_{SDH}) - (V_{growth} * [NADH])$
21	$\frac{d[NADP]}{dt} = -(2 * V_{AAtoSUC}) - (2 * V_{G6PDH}) - V_{iNOS} + V_{NADPHox} + V_{NHG} - (V_{growth} * [NADP])$

Table 3.9: Metabolite concentrations differential equations (continue)

Equation number	Metabolite equation
22	$\frac{d[NADPH]}{dt} = (2 * V_{AAtoSUC}) + (2 * V_{G6PDH}) + V_{iNOS} - V_{NADPHox} - (V_{growth} * [NADPH])$
23	$\frac{d[OXA]}{dt} = V_{ASTA} - V_{CS} + V_{MLD} + V_{PC} - (V_{growth} * [OXA])$
24	$\frac{d[PCr]}{dt} = -V_{CK} - (V_{growth} * [PCr])$
25	$\frac{d[PEP]}{dt} = V_{PGK} - V_{PK} - (V_{growth} * [PEP])$
26	$\frac{d[PYR]}{dt} = -V_{ALATA} - V_{LDH} + V_{ME} - V_{PC} - V_{PDH} + V_{PK} + V_{SDHH} - (V_{growth} * [PYR])$
27	$\frac{d[R5P]}{dt} = V_{G6PDH} - (2 * V_{NAT}) - V_{PPRibP} - (3 * V_{TK}) - (V_{growth} * [R5P]) - (V_{growth_{R5P}} * V_{growth})$
28	$\frac{d[SCOA]}{dt} = V_{AKGDH} - V_{SCOAS} - (V_{growth} * [SCOA])$
29	$\frac{d[SUC]}{dt} = (3 * V_{AAtoSUC}) + V_{SCOAS} - V_{SDH} - (V_{growth} * [SUC])$
30	$\frac{d[EARG]}{dt} = (-V_{ARGt} - V_{HISARGTA} - V_{growth_{EARG}} * V_{growth}) * ([X] * 1000)$
31	$\frac{d[ORN]}{dt} = (V_{ARG1} - V_{OCT}) * ([X] * 1000)$

Table 3.9: Metabolite concentrations differential equations (continue)

Equation number	Metabolite equation
32	$\frac{d[CTR]}{dt} = (-V_{ASS} + V_{iNOS} + V_{OCT}) * ([X] * 1000)$
33	$\frac{d[EGLC]}{dt} = (-V_{HK}) * ([X] * 1000)$
34	$\frac{d[ELAC]}{dt} = (V_{LDH}) * ([X] * 1000)$
35	$\frac{d[ETRP]}{dt} = (-V_{IDO} - V_{growth_{ETRP}} * V_{growth}) * ([X] * 1000)$
36	$\frac{d[KYN]}{dt} = (V_{IDO} - V_{KOT}) * ([X] * 1000)$
37	$\frac{d[KYT]}{dt} = (V_{KOT}) * ([X] * 1000)$
38	$\frac{d[EGLU]}{dt} = (V_{GLUt} - V_{growth_{EGLU}} * V_{growth}) * ([X] * 1000)$
39	$\frac{d[EGLN]}{dt} = (-V_{GLNt} - V_{growth_{EGLN}} * V_{growth}) * ([X] * 1000)$
40	$\frac{d[EALA]}{dt} = (V_{ALATA} - V_{growth_{EALA}} * V_{growth}) * ([X] * 1000)$
41	$\frac{d[ESER]}{dt} = (-V_{SDHH} - V_{growth_{ESER}} * V_{growth}) * ([X] * 1000)$

Table 3.9: Metabolite concentrations differential equations (continue)

Equation number	Metabolite equation
42	$\frac{d[\text{EASN}]}{dt} = (-V_{\text{ASNt}} - V_{\text{growthEASN}} * V_{\text{growth}}) * ([X] * 1000)$
43	$\frac{d[\text{EASP}]}{dt} = (-V_{\text{ASPt}} - V_{\text{growthEASP}} * V_{\text{growth}}) * ([X] * 1000)$
44	$\frac{d[\text{EILE}]}{dt} = (-V_{\text{AAtoSUC}} - V_{\text{growthEILE}} * V_{\text{growth}}) * ([X] * 1000)$
45	$\frac{d[\text{EVAL}]}{dt} = (-V_{\text{AAtoSUC}} - V_{\text{growthEVAL}} * V_{\text{growth}}) * ([X] * 1000)$
46	$\frac{d[\text{ETHR}]}{dt} = (-V_{\text{growthETHR}} * V_{\text{growth}}) * ([X] * 1000)$
47	$\frac{d[\text{ELEU}]}{dt} = (-V_{\text{AAtoSUC}} - V_{\text{growthELEU}} * V_{\text{growth}}) * ([X] * 1000)$
48	$\frac{d[\text{ETYR}]}{dt} = (-V_{\text{AAtoSUC}} - V_{\text{growthETYR}} * V_{\text{growth}}) * ([X] * 1000)$
49	$\frac{d[\text{ECYS}]}{dt} = (-V_{\text{growthECYS}} * V_{\text{growth}}) * ([X] * 1000)$
50	$\frac{d[\text{ELYS}]}{dt} = (-V_{\text{AAtoSUC}} - V_{\text{growthELYS}} * V_{\text{growth}}) * ([X] * 1000)$

Table 3.9: Metabolite concentrations differential equations (continue)

Equation number	Metabolite equation
51	$\frac{d[\text{EPRO}]}{dt} = (-V_{\text{growth}_{\text{EPRO}}} * V_{\text{growth}}) * ([X] * 1000)$
52	$\frac{d[\text{EMET}]}{dt} = (-V_{\text{growth}_{\text{EMET}}} * V_{\text{growth}}) * ([X] * 1000)$
53	$\frac{d[\text{EPHE}]}{dt} = (-V_{\text{growth}_{\text{EPHE}}} * V_{\text{growth}}) * ([X] * 1000)$
54	$\frac{d[\text{EHIS}]}{dt} = (-V_{\text{HISARGTA}} - V_{\text{growth}_{\text{EHIS}}} * V_{\text{growth}}) * ([X] * 1000)$
55	$\frac{d[\text{NH}_4]}{dt} = (V_{\text{ASN}} + V_{\text{GLDH}} + V_{\text{GLN}} + V_{\text{HISARGTA}} + V_{\text{SDHH}}) * ([X] * 1000)$
56	$\frac{d[\text{EGLY}]}{dt} = (-V_{\text{GLYt}} - V_{\text{growth}_{\text{EGLY}}} * V_{\text{growth}}) * ([X] * 1000)$
57	$\frac{d[\text{UREA}]}{dt} = (V_{\text{ARG1}}) * ([X] * 1000)$
58	$\frac{d[X]}{dt} = ([X] * V_{\text{growth}})$

Table 3.9: Metabolite concentrations differential equations (continue)

Equation number	Metabolite equation
59	$\frac{d[\text{NO}]}{dt} = (V_{\text{NOS}}) * ([\text{X}] * 1000)$
60	$\frac{d[\text{Cr}]}{dt} = (V_{\text{CK}}) * ([\text{X}] * 1000)$

CHAPITRE 4 DISCUSSION GÉNÉRALE

L'objectif de ce mémoire était de mettre en évidence les différences métaboliques induites par le nombre de passages cellulaire afin d'éliminer ce biais lors de futures études sur le caractère immunosuppresseur des cellules souches de la gelée de Wharton. Pour cela, une analyse des flux métaboliques de manière dynamique a été réalisée sur les cellules souches de la gelée de Wharton cultivées en conditions pro-inflammatoires, en passages élevé et faible. Le présent chapitre poursuit la discussion des résultats expérimentaux et de modélisations présentées au chapitre précédent.

4.1 Effet de l'âge cellulaire sur le métabolisme

Cette étude a particulièrement permis de mettre en évidence l'impact du nombre de passages cellulaire sur le métabolisme des cellules souches de la gelée de Wharton. Comme les propriétés immunosuppressives des cellules diminuent avec le nombre de passages (Weiss et al., 2008), il est nécessaire de quantifier dans un premier temps l'impact du nombre de passages sur le métabolisme. L'effet observé le plus évident est le ralentissement de la croissance cellulaire avec l'augmentation du nombre de passages, en accord avec une étude précédente de Kang et al. (Kang et al., 2004). Ce ralentissement de croissance est dû à une sénescence des cellules liée aux passages successifs (Książek, 2009). Or le taux de croissance cellulaire est le moteur du métabolisme et aura un impact sur la consommation et la production de l'ensemble des métabolites. Cela se retrouve mathématiquement avec le taux de croissance cellulaire v_{growth} qui est présent dans toutes nos équations de régulation de la concentration des métabolites. Cette différence de croissance entre les différents passages a donc inévitablement un impact sur l'ensemble du métabolisme cellulaire. Il devient donc nécessaire de quantifier ces modifications pouvant ajouter un biais à la recherche de biomarqueurs immunosuppresseurs.

À l'aide de la modélisation du métabolisme cellulaire et de la mise en évidence des paramètres sensibles, la différence de croissance cellulaire ainsi que les différences moins triviales entre le nombre de passages de culture ont pu être mises en lumière. Ainsi, même si les cultures cellulaires n'ont duré que 72 h, temps au bout duquel les cellules du passage 4 (P4) atteignent la confluence, les simulations ont été prolongées jusqu'à 135 h, permettant de prédire le comportement des cellules P9. Il a ainsi été mis en évidence, par simulations, le possible

caractère limitant du tryptophane extracellulaire, acide aminé essentiel, pour les deux cultures, conduisant à un arrêt de la croissance à 80 h et à 110 h pour les cellules en passages 4 et 9 respectivement. Il serait donc intéressant de poursuivre cette étude en faisant une culture cellulaire avec ajout de tryptophane dans le milieu de culture afin d'éviter que sa concentration ne tombe à des seuils trop bas. Cependant, le modèle métabolique ne prend pas en compte les effets stériques et mécaniques dus à la confluence cellulaire. L'ajout de tryptophane n'aurait donc pas forcément d'impact sur la fin de la croissance cellulaire qui serait induite par des gènes stériques. En effet, lors de la confluence cellulaire, les cellules sont soumises à des contraintes mécaniques conduisant à une mort cellulaire de plus en plus importante. Les cellules n'auront plus l'espace pour se diviser ou adhérer sur la plaque de culture. De plus, les cellules, en mourant, secrètent des signaux cellulaires chimiques pouvant entraîner une réaction en chaîne d'apoptoses cellulaires.

Outre la différence concernant la croissance cellulaire, cette étude a également mis en évidence des différences sur le métabolisme énergétique des WJMSC. En effet, les cellules P9 ont un cycle de régénération en ATP très rapide, majoritairement alimenté par le cycle TCA contrairement aux cellules P4 qui réussissent à avoir une forte croissance tout en fournissant de l'ATP en plus faible quantité et principalement via la glycolyse. D'ailleurs, Varum et al. ont montré par analyse de la quantité d'ATP, la production de lactate et le taux de consommation d'oxygène, que les cellules humaines pluripotentes subvenaient à leurs besoins énergétiques principalement grâce à la glycolyse (Varum et al., 2011). Cela confirme donc le métabolisme des cellules P9 qui diffère de celui des cellules souches saines, dû à leur sénescence. De plus, cette étude a montré que les cellules P4 avaient une meilleure tolérance au stress oxydatif que les cellules P9, par observation du ratio AMP sur ATP. Comme expliqué par Hardie et al. (Hardie & Hawley, 2001), une plus grande sensibilité au stress pourrait conduire à l'activation de l'*AMP-activated protein kinase* (AMPK) possiblement responsable du ralentissement de la croissance cellulaire et l'activation du cycle TCA chez les cellules P9. Afin de valider ce résultat, il serait intéressant de vérifier si l'activité de l'AMPK est bien supérieure chez les cellules P9.

Même si les cellules de passage 4 n'étaient pas significativement différentes des cellules de passage 9 au niveau des résultats de la MLR, cette étude a montré que les cellules P4 possédaient néanmoins certaines caractéristiques métaboliques propres aux cellules immunosuppressives. En effet, leur cycle de l'urée est plus actif que les cellules P9 et leur consommation de tryptophane, dû à la densité cellulaire, est plus élevée même si leur flux de consommation de tryptophane par

cellules est plus faible que les cellules P9. Ces quelques données soulignent le fait que les cellules de passage 4 n'ont pas encore perdu la totalité de leurs propriétés immunosuppressives mais sont déjà trop vieilles pour être significativement différentes des cellules P9. Il aurait été intéressant de pouvoir réaliser la même expérience mais avec des cellules de passages inférieurs à 4. Cependant les contraintes des expériences réalisées obligent un fort nombre de cellules et donc une amplification jusqu'à 4 passages. Il serait donc intéressant d'utiliser des cellules souches conservant leurs propriétés immunosuppressives à un passage supérieur ou égal à 4 ou de développer des méthodes d'analyses de métabolites intracellulaire plus performante et nécessitant une moins grande quantité de cellules. De plus, ce résultat suggère le grand besoin d'améliorer les protocoles de culture afin que se conserve le caractère immunosuppressif des cellules par le besoin d'amplification minimale avant injection chez un patient.

4.2 La structure du modèle inclue les mécanismes immunosuppressifs

Le but de ce modèle était d'intégrer les principales voies métaboliques impliquées dans le phénomène d'immunosuppression afin de préparer la future étude sur les biomarqueurs métaboliques des propriétés immunosuppressives des cellules souches de la gelée de Wharton. Pour cela, le modèle a été construit à partir d'une étude précédemment effectuée au laboratoire sur des cellules de mammifère, les cellules d'ovaire de hamster chinois (CHO), présentant un modèle comportant les principales voies du métabolisme central du carbone, à savoir la glycolyse, la voie du pentose phosphate, le cycle TCA et le métabolisme des acides aminés (Ghorbaniaghdam et al., 2014; Ghorbaniaghdam et al., 2013; Robitaille et al., 2015). Par la suite, les voies métaboliques en lien avec les propriétés immunosuppressives des cellules précédemment étudiées ont été ajoutées, à savoir le cycle de l'urée (Bronte & Zanovello, 2005; Sato et al., 2007) et l'action de l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) sur le tryptophane (Mellor & Munn, 1999). Enfin, afin d'obtenir un modèle plus représentatif de l'activité énergétique cellulaire, des réactions de synthèse de nucléotides ont été ajoutées : l'ensemble des nucléotides énergétiques et rédox sont respectivement synthétisés de novo par l'AMP et le NAD. L'ajout de nombreuses réactions aux principales voies métaboliques a conduit à grandement complexifier le

modèle en créant de nombreuses boucles réactionnelles mais a permis de mieux mettre en valeur le recyclage des métabolites essentiels au maintien et à la croissance cellulaire.

Afin de détecter de manière plus précise les différences entre les deux passages cellulaires, les réactions enzymatiques ont été simulées en utilisant des paramètres cinétiques propres à chaque réaction. Les taux réactionnels maximum, v_{max} , mais également les constantes d'affinités, km , sont spécifiques à chaque réaction et non pas au métabolite substrat ou co-facteur. Ce choix est plus représentatif de la réalité biologique où l'affinité d'un métabolite sur un site enzymatique dépend grandement de l'enzyme. Toutefois, cette approche conduit à une grande augmentation du nombre de paramètres cinétiques à déterminer. Afin de ne pas trop surcharger le modèle cependant, certaines réactions ont été simplifiées et regroupées en une réaction unique, reprenant le bilan global de ces dernières. C'est le cas pour les réactions de transport des métabolites externes vers l'intérieur de la cellule ou de la sécrétion de métabolites internes qui sont représentés par une unique réaction de transport. De même, le modèle est non compartimenté intracellulairement, les réactions mitochondriales sont donc considérées comme étant dans le même compartiment que les réactions cytoplasmiques. Ce choix a été fait dans le but de ne pas surcharger le modèle et en concentrant l'étude sur des réactions enzymatiques pouvant avoir un effet significatif sur le métabolisme. Certaines voix d'inhibitions ou d'activation ont été ajoutées car elles permettaient une meilleure représentativité des mécanismes métaboliques sur le comportement cellulaire, tel que démontré dans différentes études (Dorka, Fischer, Budman, & Scharer, 2009; Ghorbaniaghdam et al., 2014; Ghorbaniaghdam et al., 2013; Nolan & Lee, 2011; Robitaille et al., 2015). De même, l'impact des nucléotides sur les taux réactionnels s'est traduit par l'utilisation des ratios de concentrations lorsque ces métabolites étaient présents en tant que cofacteurs, une technique plus représentative également mise en valeur dans de précédentes études (Ghorbaniaghdam et al., 2014; Ghorbaniaghdam et al., 2013; Robitaille et al., 2015).

La structure de ce modèle aura donc permis d'effectuer une analyse exhaustive du comportement métabolique des WJMSC en se concentrant sur les voies réactionnelles pertinentes dans le cadre de cette étude sur l'immunosuppression. Il est à noter que le mécanisme immunosuppresseur de la prostaglandine E2 (PGE2), développé dans le chapitre 1, n'est pas mis en valeur dans cette étude. En effet, cette molécule fait principalement partie de la famille des lipides et ne pouvait donc pas être reliée au réseau métabolique actuel sans être obligé d'effectuer des raccourcis réactionnels non réalistes. De plus, la détermination de sa concentration aurait nécessité la mise en place d'une

nouvelle méthode de séparation et de détections non courantes dans notre laboratoire. Il serait toutefois intéressant dans la suite de cette étude, d'investiguer plus en détails sur le comportement de cette molécule aux différents passages de culture cellulaire de la WJMSC.

La structure de ce modèle est donc pertinente pour permettre l'analyse des propriétés immunosuppressive et pourra être réutilisée lors de futures études sur les WJMSC ou d'autres cellules possédant des propriétés immunosuppressives.

4.3 Validité du modèle

Le modèle a été résolu en utilisant une méthode développée par Rizzi et al. (Rizzi et al., 1997) consistant à décrire les variations des concentrations par des fonctions mathématiques non cinétiques, puis de les remplacer étape par étape par les équations finales décrivant les cinétiques des réactions enzymatiques. Cependant, il convenait de connaître l'évolution de l'ensemble des métabolites pour utiliser cette méthode. Pour cela, les métabolites non mesurés ont été considérés comme ayant une concentration constante dans le temps. Ce choix, bien qu'hasardeux, est justifié par l'origine de la simulation dynamique, à savoir l'analyse des flux métabolique (MFA). En effet, dans la MFA, les concentrations de tous les métabolites intracellulaires sont considérées constantes dans le temps avec l'approximation des équilibres quasi-stationnaires (AEQS). Cette approximation n'est plus prise en compte dans le cas d'une modélisation dynamique. Cependant, notre modèle contient un nombre de paramètres grandement supérieur aux nombres d'inconnues, et aurait donc pu simuler n'importe quelle évolution de concentration pour celles non déterminées. Il a donc été décidé de prendre en compte l'AEQS pour les concentrations non déterminées lors de la réalisation des étapes de résolution du modèle. Cela a eu pour effet de limiter les trop grandes variations des concentrations non déterminées et de se rapprocher le plus possible des concentrations réelles de ces métabolites. La résolution mathématique du modèle ne peut se faire sans connaître les conditions initiales de la culture. Pour cela, les concentrations initiales des métabolites non déterminées ont dû être estimées à partir d'autres études portant sur des cellules similaires (Hammami, Chen, Murschel, et al., 2012). Les simulations dépendent des conditions initiales, il serait donc intéressant de développer des méthodes d'analyses plus performantes afin de connaître précisément les concentrations de l'ensemble des métabolites

étudiés, décrire plus précisément le métabolisme des WJMSC et pouvoir être en mesure de résoudre un système pleinement déterminé mathématiquement.

234 valeurs de paramètres ont été déterminées y compris les doubles valeurs des paramètres sensibles. Il serait possible de comparer les valeurs obtenues avec celles contenues dans la littérature. Cependant, les études de détermination des paramètres de réactions enzymatiques se font principalement *in vitro* et en se concentrant sur cette unique réaction tandis que notre modèle prend en compte un réseau interconnecté de réactions se produisant *in vivo* et pouvant s'influencer entre-elles via des mécanismes de régulation. De plus, comme précédemment souligné, certaines réactions utilisées n'ont pas d'équivalents réels car ne sont que des regroupements de différentes réactions successives ou imbriquées, en vue de simplifier le modèle. Une comparaison des valeurs des paramètres n'est donc pas possible, cependant, les flux réactionnels peuvent être comparés tel qu'effectué au chapitre 2.

Les simulations du modèle ont permis de décrire, et parfois prédire, l'évolution du métabolisme cellulaire jusqu'à 135 h alors que les cultures cellulaires ont été stoppées à 72h pour cause de confluence en P4. Il serait intéressant de vérifier la prédictibilité du modèle en réalisant une culture des cellules P9 sur un temps supérieur à 72h afin de vérifier si le temps d'arrêt de croissance cellulaire prédit par le modèle correspond bien à celui observé expérimentalement, ou du moins l'évolution des concentrations en nutriments et métabolites avant confluence. De plus, il serait intéressant de changer les paramètres initiaux de culture afin de voir si le modèle s'adapte et prédit également l'évolution du métabolisme cellulaire. À cet effet, le modèle pourrait être utilisé à titre prédictif dans des travaux d'optimisation de la composition du milieu de culture.

Grâce à l'identification des paramètres sensibles et la détermination des 202 autres paramètres, il serait, à notre humble avis, possible d'utiliser ce modèle pour la description de cellules WJMSC d'un autre nombre de passage, à titre prédictif et afin d'évaluer justement le caractère prédictif du modèle. Il est attendu, selon des travaux antérieurs (Ghorbaniaghdam et al., 2014), que les paramètres non sensibles pour les WJMSC pourraient s'avérer sensibles pour d'autres types cellulaires éloignés des WJMSC.

CHAPITRE 5 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

L'objectif initial de ce projet était de mettre en évidence des biomarqueurs métaboliques traduisant les propriétés immunosuppressives des cellules souches mésenchymateuses de la gelée de Wharton (WJMSC). Aussi, bien que certaines pistes de biomarqueurs assurément liés au caractère immunosuppressif aient été clairement identifiés chez les cellules ayant subies un nombre restreint de passage (P4), de nouveaux biomarqueurs reliés plutôt à la sénescence cellulaire après un nombre important de passages (P9) ont pu être identifiés. Cette étude a donc constitué une première étape de développement pertinente en présentant les différences métaboliques de WJMSCs à passages faible (P4) ou élevé (P9) aux propriétés identiques sur le plan immunosuppressif. Les biomarqueurs identifiés permettront éventuellement d'éliminer le biais dû à la sénescence cellulaire sur le métabolisme lors de futurs travaux portant sur des WJMSC significativement immunosuppressives (i.e. à passages antérieurs à P4) et des WJMSC P9 significativement non-immunosuppressive. Les différentes cultures cellulaires effectuées ont également fourni de tous premiers résultats expérimentaux sur les concentrations en métabolites intra et extracellulaire, résultats qui ont pu être enrichis grâce à la modélisation des flux enzymatiques permis par une méthode d'analyse dynamique des flux métaboliques cinétiques. Cette étude a donc mis en évidence l'influence du nombre de passages sur le ralentissement de la croissance cellulaire, impactant l'ensemble du métabolisme. Les cellules à passage élevé ont un besoin en métabolites énergétiques plus important pour leur maintenance et réorientent donc leur flux glycolytique vers le cycle TCA contrairement aux cellules P4 qui orientent ce flux vers la production de lactate. L'ATP est grandement recyclée dans le cas des cellules P9, processus qui emprunte principalement le cycle TCA tandis que le taux de recyclage de l'ATP dans les cellules P4 est plus faible et provient principalement de la glycolyse. L'analyse du ratio AMP sur ATP pourrait justifier ces observations en mettant en évidence une faible tolérance du stress oxydatif des cellules P9 contrairement aux P4. Même si les cellules P4 ne sont pas significativement immunosuppressives, elles possèdent un cycle de l'urée plus actif que les cellules P9 et conduisent à une diminution plus rapide du tryptophane extracellulaire, deux caractéristiques observées chez des cellules immunosuppressives. Il semble donc que les cellules P4 soient déjà à un stade trop avancé dans leur nombre de passages, ce qui conduit au chevauchement de leurs caractéristiques immunosuppressives par des effets dû à un début de sénescence cellulaire.

Le travail effectué dans le cadre de ce mémoire de maîtrise s'inscrit dans un projet plus vaste sur la mise en évidence de biomarqueurs de l'activité immunosuppressive de cellules souches, dans le but d'améliorer les protocoles de sélection de cellules pour une thérapie cellulaire. Il convient donc de poursuivre cette étude en s'appuyant sur les résultats obtenus dans ce travail. Le modèle développé pourra, d'une part, servir de base solide pour l'étude par modélisation des futures cellules étudiées, il suffira de ne modifier qu'un groupe restreint de paramètres sensibles mis en évidence dans ce mémoire pour adapter la simulation. Grâce aux biomarqueurs identifiés, liés à la sénescence cellulaire, les futures comparaisons pourront déterminer les biomarqueurs liés à l'immunosuppression sans être influencées par le biais dû aux différents passages cellulaires.

Au vu de cette première étude, il serait judicieux de poursuivre le développement de nouvelles méthodes d'analyses afin de pouvoir suivre l'évolution de nouveaux métabolites significatifs et d'analyser un réseau plus complet et représentatif des subtilités reliées au phénotype immunosuppresseur. De même, il serait intéressant de pouvoir pratiquer ces analyses sur un nombre plus restreint de cellules, ce qui permettrait d'étudier des cellules avec un passage plus faible, car seulement peu de cellules peuvent être prélevées d'un cordon ombilical. La future étude devra, d'autre part, s'attarder à vérifier que les cellules sont bien significativement immunosuppressives contrairement à la présente étude. Il sera donc nécessaire de prendre des WJMSC à un passage plus faible, ou un autre type cellulaire présentant des propriétés immunosuppressives équivalentes ou même supérieures. D'autres cellules récupérables de manière non invasive, les cellules périvasculaires du cordon ombilical (HUCPVC), semblent également prometteuses pour cette future étude car elles possèdent un caractère immunosuppresseur fort. De plus, ces cellules partagent de grandes similarités avec les WJMSC, la réutilisation du modèle développé dans ce travail sera donc envisageable et accélérera l'étude de leur métabolisme.

BIBLIOGRAPHIE

- Ahn, W. S., & Antoniewicz, M. R. (2011). Metabolic flux analysis of CHO cells at growth and non-growth phases using isotopic tracers and mass spectrometry. *Metabolic Engineering*, 13(5), 598-609.
- Antoniewicz, M. R. (2013). Dynamic metabolic flux analysis—tools for probing transient states of metabolic networks. *Current opinion in biotechnology*, 24(6), 973-978.
- Antoniewicz, M. R. (2015). Methods and advances in metabolic flux analysis: a mini-review. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 42(3), 317-325.
- Asari, S., Itakura, S., Ferreri, K., Liu, C.-P., Kuroda, Y., Kandeel, F., & Mullen, Y. (2009). Mesenchymal stem cells suppress B-cell terminal differentiation. *Experimental hematology*, 37(5), 604-615.
- Bastin, B., Payet, M. D., & Dupuis, G. (1990). Effects of modulators of adenylyl cyclase on interleukin-2 production, cytosolic Ca²⁺ elevation, and K⁺ channel activity in Jurkat T cells. *Cellular immunology*, 128(2), 385-399.
- Belardelli, F. (1995). Role of interferons and other cytokines in the regulation of the immune response. *Apmis*, 103(1-6), 161-179.
- Betz, M., & Fox, B. (1991). Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. *The Journal of Immunology*, 146(1), 108-113.
- Bingisser, R. M., Tilbrook, P. A., Holt, P. G., & Kees, U. R. (1998). Macrophage-derived nitric oxide regulates T cell activation via reversible disruption of the Jak3/STAT5 signaling pathway. *The Journal of Immunology*, 160(12), 5729-5734.
- Bishai, I. E. M., El Ansary, M. S., Shaheen, N. M. H., & Farid, R. J. (2013). Mesenchymal stem cell separation from Wharton's jelly and its differentiation into keratinocytes. *Comparative Clinical Pathology*, 22(4), 547-553.
- Bogdan, C. (2001). Nitric oxide and the immune response. *Nature immunology*, 2(10), 907-916.
- Boghigian, B. A., Seth, G., Kiss, R., & Pfeifer, B. A. (2010). Metabolic flux analysis and pharmaceutical production. *Metabolic Engineering*, 12(2), 81-95.
- Bronte, V., & Zanovello, P. (2005). Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nature Reviews Immunology*, 5(8), 641-654.
- Chassagnole, C., Noisommit-Rizzi, N., Schmid, J. W., Mauch, K., & Reuss, M. (2002). Dynamic modeling of the central carbon metabolism of Escherichia coli. *Biotechnology and bioengineering*, 79(1), 53-73.
- Chen, M.-Y., Lie, P.-C., Li, Z.-L., & Wei, X. (2009). Endothelial differentiation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Experimental hematology*, 37(5), 629-640.
- Cloutier, M., Perrier, M., & Jolicoeur, M. (2007). Dynamic flux cartography of hairy roots primary metabolism. *Phytochemistry*, 68(16), 2393-2404.

- Dash, R. K., Li, Y., Kim, J., Saidel, G. M., & Cabrera, M. E. (2008). Modeling cellular metabolism and energetics in skeletal muscle: large-scale parameter estimation and sensitivity analysis. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 55(4), 1298-1318.
- Dazzi, F., van Laar, J. M., Cope, A., & Tyndall, A. (2007). Cell therapy for autoimmune diseases. *Arthritis research & therapy*, 9(2), 1.
- de Witte, S. F., Franquesa, M., Baan, C. C., & Hoogduijn, M. J. (2015). Toward Development of iMesenchymal Stem Cells for immunomodulatory Therapy. *Frontiers in immunology*, 6.
- Dell'mour, M., Jaitz, L., Oburger, E., Puschenreiter, M., Koellensperger, G., & Hann, S. (2010). Hydrophilic interaction LC combined with electrospray MS for highly sensitive analysis of underivatized amino acids in rhizosphere research. *Journal of separation science*, 33(6-7), 911-922.
- Dersch, L. M., Beckers, V., & Wittmann, C. (2016). Green pathways: metabolic network analysis of plant systems. *Metabolic Engineering*, 34, 1-24.
- Di Nicola, M., Carlo-Stella, C., Magni, M., Milanese, M., Longoni, P. D., Matteucci, P., . . . Gianni, A. M. (2002). Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*, 99(10), 3838-3843.
- Djouad, F., Charbonnier, L. M., Bouffi, C., Louis-Plence, P., Bony, C., Apparailly, F., . . . Noel, D. (2007). Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. *Stem cells*, 25(8), 2025-2032.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., . . . Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315-317.
- Dorka, P., Fischer, C., Budman, H., & Scharer, J. M. (2009). Metabolic flux-based modeling of mAb production during batch and fed-batch operations. *Bioprocess and biosystems engineering*, 32(2), 183-196.
- Edwards, J., & Palsson, B. (2000). The Escherichia coli MG1655 in silico metabolic genotype: its definition, characteristics, and capabilities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(10), 5528-5533.
- Estrada, J., Albo, C., Benguria, A., Dopazo, A., Lopez-Romero, P., Carrera-Quintanar, L., . . . Bernad, A. (2012). Culture of human mesenchymal stem cells at low oxygen tension improves growth and genetic stability by activating glycolysis. *Cell death and differentiation*, 19(5), 743.
- Fallarino, F., Grohmann, U., Vacca, C., Orabona, C., Spreca, A., Fioretti, M. C., & Puccetti, P. (2003). T cell apoptosis by kynurenines *Developments in tryptophan and serotonin metabolism* (pp. 183-190): Springer.
- Fallarino, F., Grohmann, U., You, S., McGrath, B. C., Cavener, D. R., Vacca, C., . . . Volpi, C. (2006). The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor ζ -chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *The Journal of Immunology*, 176(11), 6752-6761.

- Fedyk, E. R., & Phipps, R. P. (1996). Prostaglandin E2 receptors of the EP2 and EP4 subtypes regulate activation and differentiation of mouse B lymphocytes to IgE-secreting cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(20), 10978-10983.
- Feist, A. M., & Palsson, B. O. (2010). The biomass objective function. *Current opinion in microbiology*, 13(3), 344-349.
- Feldmeyer, N., Wabnitz, G., Leicht, S., Luckner-Minden, C., Schiller, M., Franz, T., . . . Ho, A. D. (2012). Arginine deficiency leads to impaired cofilin dephosphorylation in activated human T lymphocytes. *International immunology*, 24(5), 303-313.
- Fell, D. A. (1998). Increasing the flux in metabolic pathways: a metabolic control analysis perspective. *Biotechnology and bioengineering*, 58(2-3), 121-124.
- Ferrara, J. L., Levine, J. E., Reddy, P., & Holler, E. (2009). Graft-versus-host disease. *The Lancet*, 373(9674), 1550-1561.
- Fiehn, O. (2002). Metabolomics—the link between genotypes and phenotypes. *Plant molecular biology*, 48(1-2), 155-171.
- Fischer, T. A., Palmetshofer, A., Gambaryan, S., Butt, E., Jassoy, C., Walter, U., . . . Lohmann, S. M. (2001). Activation of cGMP-dependent protein kinase I β inhibits interleukin 2 release and proliferation of T cell receptor-stimulated human peripheral T cells. *Journal of Biological Chemistry*, 276(8), 5967-5974.
- Gabrilovich, D. I., & Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 9(3), 162-174.
- Galipeau, J. (2013). The mesenchymal stromal cells dilemma—does a negative phase III trial of random donor mesenchymal stromal cells in steroid-resistant graft-versus-host disease represent a death knell or a bump in the road? *Cytotherapy*, 15(1), 2-8.
- Gao, J., Gorenflo, V. M., Scharer, J. M., & Budman, H. M. (2007). Dynamic metabolic modeling for a MAB bioprocess. *Biotechnology progress*, 23(1), 168-181.
- Ghannam, S., Bouffi, C., Djouad, F., Jorgensen, C., & Noël, D. (2010). Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. *Stem cell research & therapy*, 1(1), 1.
- Ghorbaniaghdam, A., Chen, J., Henry, O., & Jolicoeur, M. (2014). Analyzing clonal variation of monoclonal antibody-producing CHO cell lines using an in silico metabolomic platform. *PloS one*, 9(3), e90832.
- Ghorbaniaghdam, A., Henry, O., & Jolicoeur, M. (2013). A kinetic-metabolic model based on cell energetic state: study of CHO cell behavior under Na-butyrate stimulation. *Bioprocess and biosystems engineering*, 36(4), 469-487.
- Gopalakrishnan, S., & Maranas, C. D. (2015). ¹³C metabolic flux analysis at a genome-scale. *Metabolic Engineering*, 32, 12-22.
- Goudar, C., Biener, R., Boisart, C., Heidemann, R., Piret, J., de Graaf, A., & Konstantinov, K. (2010). Metabolic flux analysis of CHO cells in perfusion culture by metabolite balancing and 2D [¹³C, ¹H] COSY NMR spectroscopy. *Metabolic Engineering*, 12(2), 138-149.

- Guoyao, W., & Morris, S. M. (1998). Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochemical Journal*, 336(1), 1-17.
- Hagrot, E., Oddsdóttir, H. Æ., Hosta, J. G., Jacobsen, E. W., & Chotteau, V. (2016). Polypathway model, a novel approach to simulate multiple metabolic states by reaction network-based model—Application to amino acid depletion in CHO cell culture. *Journal of biotechnology*, 228, 37-49.
- Hamberg, M., Svensson, J., & Samuelsson, B. (1974). Prostaglandin endoperoxides. A new concept concerning the mode of action and release of prostaglandins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 71(10), 3824-3828.
- Hammami, I., Bertrand, M., Chen, J., Bronte, V., De Crescenzo, G., & Jolicoeur, M. (2012). Nitric oxide affects immune cells bioenergetics: long-term effects of nitric-oxide derivatives on leukaemic Jurkat cell metabolism. *Immunobiology*, 217(8), 808-815.
- Hammami, I., Chen, J., Bronte, V., DeCrescenzo, G., & Jolicoeur, M. (2012). L-glutamine is a key parameter in the immunosuppression phenomenon. *Biochemical and biophysical research communications*, 425(4), 724-729.
- Hammami, I., Chen, J., Murschel, F., Bronte, V., De Crescenzo, G., & Jolicoeur, M. (2012). Immunosuppressive activity enhances central carbon metabolism and bioenergetics in myeloid-derived suppressor cells in vitro models. *BMC cell biology*, 13(1), 1.
- Hardie, D. G., & Carling, D. (1997). The AMP-activated protein kinase. *The FEBS Journal*, 246(2), 259-273.
- Hardie, D. G., & Hawley, S. A. (2001). AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited. *Bioessays*, 23(12), 1112-1119.
- Hardie, D. G., Hawley, S. A., & Scott, J. W. (2006). AMP-activated protein kinase—development of the energy sensor concept. *The Journal of physiology*, 574(1), 7-15.
- Harris, S. G., Padilla, J., Koumas, L., Ray, D., & Phipps, R. P. (2002). Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends in immunology*, 23(3), 144-150.
- He, L., Xiao, Y., Gebreselassie, N., Zhang, F., Antoniewicz, M. R., Tang, Y. J., & Peng, L. (2014). Central metabolic responses to the overproduction of fatty acids in *Escherichia coli* based on ¹³C-metabolic flux analysis. *Biotechnology and bioengineering*, 111(3), 575-585.
- Heikkinen, J., Möttönen, M., Komi, J., Alanen, A., & Lassila, O. (2003). Phenotypic characterization of human decidual macrophages. *Clinical & Experimental Immunology*, 131(3), 498-505.
- Ho, A., Wagner, W., & Franke, W. (2009). Heterogeneity of mesenchymal stromal cell preparations. *Cytotherapy*.
- Hundal, H., Rennie, M., & Watt, P. (1989). Characteristics of acidic, basic and neutral amino acid transport in the perfused rat hindlimb. *The Journal of physiology*, 408(1), 93-114.
- Italiani, P., & Boraschi, D. (2015). From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation. *M1/M2 Macrophages: The Arginine Fork in the Road to Health and Disease*, 47.

- Janakiram, N. B., & Rao, C. V. (2015). Nitric oxide: immune modulation of tumor growth *Nitric Oxide and Cancer: Pathogenesis and Therapy* (pp. 159-175): Springer.
- Kaliński, P., Hilkens, C. M., Snijders, A., Snijdwint, F. G., & Kapsenberg, M. L. (1997). Dendritic cells, obtained from peripheral blood precursors in the presence of PGE₂, promote Th2 responses *Dendritic Cells in Fundamental and Clinical Immunology* (pp. 363-367): Springer.
- Kang, T. J., Yeom, J.-E., Lee, H. J., Rho, S. H., Han, H., & Chae, G.-T. (2004). Growth kinetics of human mesenchymal stem cells from bone marrow and umbilical cord blood. *Acta haematologica*, 112(4), 230-233.
- Kauffman, K. J., Prakash, P., & Edwards, J. S. (2003). Advances in flux balance analysis. *Current opinion in biotechnology*, 14(5), 491-496.
- Kimball, E., & Rabinowitz, J. D. (2006). Identifying decomposition products in extracts of cellular metabolites. *Analytical biochemistry*, 358(2), 273-280.
- Kondoh, H., Leonart, M. E., Nakashima, Y., Yokode, M., Tanaka, M., Bernard, D., . . . Beach, D. (2007). A high glycolytic flux supports the proliferative potential of murine embryonic stem cells. *Antioxidants & redox signaling*, 9(3), 293-299.
- Krampera, M., Cosmi, L., Angeli, R., Pasini, A., Liotta, F., Andreini, A., . . . Vinante, F. (2006). Role for interferon- γ in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem cells*, 24(2), 386-398.
- Krampera, M., Galipeau, J., Shi, Y., Tarte, K., & Sensebe, L. (2013). Immunological characterization of multipotent mesenchymal stromal cells—The International Society for Cellular Therapy (ISCT) working proposal. *Cytotherapy*, 15(9), 1054-1061.
- Książek, K. (2009). A comprehensive review on mesenchymal stem cell growth and senescence. *Rejuvenation research*, 12(2), 105-116.
- Kunkel, S., Wiggins, R., Chensue, S., & Larrick, J. (1986). Regulation of macrophage tumor necrosis factor production by prostaglandin E₂. *Biochemical and biophysical research communications*, 137(1), 404-410.
- Kusmartsev, S., Nefedova, Y., Yoder, D., & Gabrilovich, D. I. (2004). Antigen-specific inhibition of CD8⁺ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species. *The Journal of Immunology*, 172(2), 989-999.
- Le Blanc, K., Rasmusson, I., Sundberg, B., Götherström, C., Hassan, M., Uzunel, M., & Ringdén, O. (2004). Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *The Lancet*, 363(9419), 1439-1441.
- Le Blanc, K., & Ringden, O. (2007). Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *Journal of internal medicine*, 262(5), 509-525.
- Le Blanc, K., Tammik, C., Rosendahl, K., Zetterberg, E., & Ringdén, O. (2003). HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Experimental hematology*, 31(10), 890-896.
- Leduc, M., Tikhomiroff, C., Cloutier, M., Perrier, M., & Jolicoeur, M. (2006). Development of a kinetic metabolic model: application to *Catharanthus roseus* hairy root. *Bioprocess and biosystems engineering*, 28(5), 295-313.

- Lewis, C., Leek, R., Harris, A., & McGee, J. (1995). Cytokine regulation of angiogenesis in breast cancer: the role of tumor-associated macrophages. *Journal of leukocyte biology*, 57(5), 747-751.
- Llaneras, F., & Picó, J. (2007). A procedure for the estimation over time of metabolic fluxes in scenarios where measurements are uncertain and/or insufficient. *BMC bioinformatics*, 8(1), 1.
- Ma, S., Xie, N., Li, W., Yuan, B., Shi, Y., & Wang, Y. (2014). Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death & Differentiation*, 21(2), 216-225.
- Majumdar, M. K., Keane-Moore, M., Buyaner, D., Hardy, W. B., Moorman, M. A., McIntosh, K. R., & Mosca, J. D. (2003). Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *Journal of biomedical science*, 10(2), 228-241.
- Mao, Y., Poschke, I., & Kiessling, R. (2014). Tumour-induced immune suppression: role of inflammatory mediators released by myelomonocytic cells. *Journal of internal medicine*, 276(2), 154-170.
- Meisel, R., Zibert, A., Laryea, M., Göbel, U., Däubener, W., & Dilloo, D. (2004). Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2, 3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood*, 103(12), 4619-4621.
- Mellor, A. L., & Munn, D. H. (1999). Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: immunosuppression by starvation? *Immunology today*, 20(10), 469-473.
- Menard, C., Pacelli, L., Bassi, G., Dulong, J., Bifari, F., Bezier, I., . . . Bourin, P. (2013). Clinical-grade mesenchymal stromal cells produced under various good manufacturing practice processes differ in their immunomodulatory properties: standardization of immune quality controls. *Stem cells and development*, 22(12), 1789-1801.
- Molon, B., Ugel, S., Del Pozzo, F., Soldani, C., Zilio, S., Avella, D., . . . Rescigno, M. (2011). Chemokine nitration prevents intratumoral infiltration of antigen-specific T cells. *The Journal of experimental medicine*, 208(10), 1949-1962.
- Morris Jr, S. M. (2002). Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. *Annual review of nutrition*, 22(1), 87-105.
- Munder, M., Engelhardt, M., Knies, D., Medenhoff, S., Wabnitz, G., Luckner-Minden, C., . . . Müller, I. (2013). Cytotoxicity of tumor antigen specific human T cells is unimpaired by arginine depletion. *PloS one*, 8(5), e63521.
- Munn, D. H., Shafizadeh, E., Attwood, J. T., Bondarev, I., Pashine, A., & Mellor, A. L. (1999). Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *The Journal of experimental medicine*, 189(9), 1363-1372.
- Munn, D. H., Sharma, M. D., Baban, B., Harding, H. P., Zhang, Y., Ron, D., & Mellor, A. L. (2005). GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2, 3-dioxygenase. *Immunity*, 22(5), 633-642.
- Murdoch, C., Muthana, M., Coffelt, S. B., & Lewis, C. E. (2008). The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 8(8), 618-631.
- Nagamatsu, T., & Schust, D. J. (2010). Review: the immunomodulatory roles of macrophages at the maternal—fetal interface. *Reproductive Sciences*, 17(3), 209-218.

- Nagaraj, S., & Gabrilovich, D. I. (2008). Tumor escape mechanism governed by myeloid-derived suppressor cells. *Cancer research*, 68(8), 2561-2563.
- Napolitani, G., Acosta-Rodriguez, E. V., Lanzavecchia, A., & Sallusto, F. (2009). Prostaglandin E2 enhances Th17 responses via modulation of IL-17 and IFN- γ production by memory CD4⁺ T cells. *European journal of immunology*, 39(5), 1301-1312.
- Nolan, R. P., & Lee, K. (2011). Dynamic model of CHO cell metabolism. *Metabolic Engineering*, 13(1), 108-124.
- Obeid, E., Nanda, R., Fu, Y.-X., & Olopade, O. I. (2013). The role of tumor-associated macrophages in breast cancer progression (review). *International journal of oncology*, 43(1), 5-12.
- Ostuni, R., Kratochvill, F., Murray, P. J., & Natoli, G. (2015). Macrophages and cancer: from mechanisms to therapeutic implications. *Trends in immunology*, 36(4), 229-239.
- Panopoulos, A. D., Yanes, O., Ruiz, S., Kida, Y. S., Diep, D., Tautenhahn, R., . . . Lutz, M. (2012). The metabolome of induced pluripotent stem cells reveals metabolic changes occurring in somatic cell reprogramming. *Cell research*, 22(1), 168-177.
- Pekarova, M., & Lojek, A. (2015). The crucial role of l-arginine in macrophage activation: what you need to know about it. *Life sciences*, 137, 44-48.
- Phinney, D. G., & Sensebé, L. (2013). Mesenchymal stromal cells: misconceptions and evolving concepts. *Cytotherapy*, 15(2), 140-145.
- Prasanna, S. J., Gopalakrishnan, D., Shankar, S. R., & Vasandan, A. B. (2010). Pro-inflammatory cytokines, IFN γ and TNF α , influence immune properties of human bone marrow and Wharton jelly mesenchymal stem cells differentially. *PloS one*, 5(2), e9016.
- Preinerstorfer, B., Schiesel, S., Lämmerhofer, M., & Lindner, W. (2010). Metabolic profiling of intracellular metabolites in fermentation broths from β -lactam antibiotics production by liquid chromatography–tandem mass spectrometry methods. *Journal of chromatography A*, 1217(3), 312-328.
- Prodinger, J., Loacker, L. J., Schmidt, R. L., Ratzinger, F., Greiner, G., Witzeneder, N., . . . Steinberger, P. (2016). The tryptophan metabolite picolinic acid suppresses proliferation and metabolic activity of CD4⁺ T cells and inhibits c-Myc activation. *Journal of leukocyte biology*, 99(4), 583-594.
- Provost, A., Bastin, G., Agathos, S., & Schneider, Y.-J. (2006). Metabolic design of macroscopic bioreaction models: application to Chinese hamster ovary cells. *Bioprocess and biosystems engineering*, 29(5-6), 349-366.
- Quek, L.-E., Dietmair, S., Krömer, J. O., & Nielsen, L. K. (2010). Metabolic flux analysis in mammalian cell culture. *Metabolic Engineering*, 12(2), 161-171.
- Radi, R. (2004). Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(12), 4003-4008.
- Rappaport, R., & Dodge, G. (1982). Prostaglandin E inhibits the production of human interleukin 2. *The Journal of experimental medicine*, 155(3), 943-948.

- Ren, G., Zhang, L., Zhao, X., Xu, G., Zhang, Y., Roberts, A. I., . . . Shi, Y. (2008). Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell stem cell*, 2(2), 141-150.
- Renner, P., Eggenhofer, E., Rosenauer, A., Popp, F., Steinmann, J., Slowik, P., . . . Dahlke, M. (2009). *Mesenchymal stem cells require a sufficient, ongoing immune response to exert their immunosuppressive function*. Paper presented at the Transplantation proceedings.
- Rizzi, M., Baltes, M., Theobald, U., & Reuss, M. (1997). In vivo analysis of metabolic dynamics in *Saccharomyces cerevisiae*: II. mathematical model. *Biotechnology and bioengineering*, 55(4), 592-608.
- Robitaille, J., Chen, J., & Jolicoeur, M. (2015). A Single Dynamic Metabolic Model Can Describe mAb Producing CHO Cell Batch and Fed-Batch Cultures on Different Culture Media. *PloS one*, 10(9), e0136815.
- Rodríguez, P. C., & Ochoa, A. C. (2008). Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives. *Immunological reviews*, 222(1), 180-191.
- Rodriguez, P. C., Quiceno, D. G., & Ochoa, A. C. (2007). L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression. *Blood*, 109(4), 1568-1573.
- Rodriguez, P. C., Quiceno, D. G., Zabaleta, J., Ortiz, B., Zea, A. H., Piazuolo, M. B., . . . Sotomayor, E. M. (2004). Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses. *Cancer research*, 64(16), 5839-5849.
- Rodriguez, P. C., Zea, A. H., Culotta, K. S., Zabaleta, J., Ochoa, J. B., & Ochoa, A. C. (2002). Regulation of t cell receptor cd3 ζ chain expression by l-arginine. *Journal of Biological Chemistry*, 277(24), 21123-21129.
- Rosenberg, S. A., Yang, J. C., & Restifo, N. P. (2004). Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nature medicine*, 10(9), 909-915.
- Ryan, J., Barry, F., Murphy, J., & Mahon, B. (2007). Interferon- γ does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clinical & Experimental Immunology*, 149(2), 353-363.
- Sato, K., Ozaki, K., Oh, I., Meguro, A., Hatanaka, K., Nagai, T., . . . Ozawa, K. (2007). Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood*, 109(1), 228-234.
- Schulze, E., & Steiger, E. (1887). Ueber das Arginin. *Zeitschrift für physiologische Chemie*, 11(1-2), 43-65.
- Segel, I. Enzyme Kinetics: Behaviour and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems, 1993: New York: John Wiley & Sons.
- Sengupta, N., Rose, S. T., & Morgan, J. A. (2011). Metabolic flux analysis of CHO cell metabolism in the late non-growth phase. *Biotechnology and bioengineering*, 108(1), 82-92.

- Serafini, P., Borrello, I., & Bronte, V. (2006). *Myeloid suppressor cells in cancer: recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression*. Paper presented at the Seminars in cancer biology.
- Sheikh, K., Förster, J., & Nielsen, L. K. (2005). Modeling hybridoma cell metabolism using a generic genome-scale metabolic model of *Mus musculus*. *Biotechnology progress*, 21(1), 112-121.
- Shibata, M., Gonda, K., & Takenoshita, S. (2016). MDSC: Myeloid-Derived Suppressor Cells *Immunotherapy of Cancer* (pp. 323-334): Springer.
- Shlomi, T., Cabili, M. N., & Rupp, E. (2009). Predicting metabolic biomarkers of human inborn errors of metabolism. *Molecular systems biology*, 5(1), 263.
- Shuler, M. L., & Kargi, F. (1992). *Bioprocess Engineering: Basic Concepts*, Prentice-Hall. Englewood Cliffs.
- Sicinska, E., Aifantis, I., Le Cam, L., Swat, W., Borowski, C., Yu, Q., . . . Von Boehmer, H. (2003). Requirement for cyclin D3 in lymphocyte development and T cell leukemias. *Cancer cell*, 4(6), 451-461.
- Sidoli, F., Mantalaris, A., & Asprey, S. (2004). Modelling of mammalian cells and cell culture processes. *Cytotechnology*, 44(1-2), 27-46.
- Siegel, G., Schäfer, R., & Dazzi, F. (2009). The immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells. *Transplantation*, 87(9S), S45-S49.
- Simmons, D. L., Botting, R. M., & Hla, T. (2004). Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacological reviews*, 56(3), 387-437.
- Snijdwint, F., Kaliński, P., Wierenga, E., Bos, J., & Kapsenberg, M. (1993). Prostaglandin E2 differentially modulates cytokine secretion profiles of human T helper lymphocytes. *The Journal of Immunology*, 150(12), 5321-5329.
- Spaggiari, G. M., Capobianco, A., Abdelrazik, H., Becchetti, F., Mingari, M. C., & Moretta, L. (2008). Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2, 3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood*, 111(3), 1327-1333.
- Sreeramkumar, V., Fresno, M., & Cuesta, N. (2012). Prostaglandin E2 and T cells: friends or foes&quest. *Immunology and cell biology*, 90(6), 579-586.
- Steinman, L. (1996). Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. *Cell*, 85(3), 299-302.
- Stelling, J., Klamt, S., Bettenbrock, K., Schuster, S., & Gilles, E. D. (2002). Metabolic network structure determines key aspects of functionality and regulation. *Nature*, 420(6912), 190-193.
- Stephanopoulos, G., Aristidou, A. A., & Nielsen, J. (1998). *Metabolic engineering: principles and methodologies*: Academic press.
- Takikawa, O. (2005). Biochemical and medical aspects of the indoleamine 2, 3-dioxygenase-initiated L-tryptophan metabolism. *Biochemical and biophysical research communications*, 338(1), 12-19.

- Templeton, N., Dean, J., Reddy, P., & Young, J. D. (2013). Peak antibody production is associated with increased oxidative metabolism in an industrially relevant fed-batch CHO cell culture. *Biotechnology and bioengineering*, 110(7).
- Trinh, C. T., Wlaschin, A., & Sreenc, F. (2009). Elementary mode analysis: a useful metabolic pathway analysis tool for characterizing cellular metabolism. *Applied microbiology and biotechnology*, 81(5), 813-826.
- Uotila, P. (1996). The role of cyclic AMP and oxygen intermediates in the inhibition of cellular immunity in cancer. *Cancer immunology, immunotherapy: CII*, 43(1), 1-9.
- Valancin, A., Srinivasan, B., Rivoal, J., & Jolicoeur, M. (2013). Analyzing the effect of decreasing cytosolic triosephosphate isomerase on *Solanum tuberosum* hairy root cells using a kinetic–metabolic model. *Biotechnology and bioengineering*, 110(3), 924-935.
- Vallino, J. J., & Stephanopoulos, G. (1989). Flux determination in cellular bioreaction networks: applications to lysine fermentations. *Frontiers in bioprocessing*, 1, 205-219.
- Van der Pouw Kraan, T., Boeije, L., Smeenk, R., Wijdenes, J., & Aarden, L. A. (1995). Prostaglandin-E2 is a potent inhibitor of human interleukin 12 production. *The Journal of experimental medicine*, 181(2), 775-779.
- Varum, S., Rodrigues, A. S., Moura, M. B., Momcilovic, O., Easley IV, C. A., Ramalho-Santos, J., . . . Schatten, G. (2011). Energy metabolism in human pluripotent stem cells and their differentiated counterparts. *PloS one*, 6(6), e20914.
- Walker, W., & Rotondo, D. (2004). Prostaglandin E2 is a potent regulator of interleukin-12-and interleukin-18-induced natural killer cell interferon- γ synthesis. *Immunology*, 111(3), 298-305.
- Wang, D., & DuBois, R. N. (2013). Inflammatory mediator prostaglandin E2 in colorectal cancer. *Cancer journal (Sudbury, Mass.)*, 19(6), 502.
- Wang, S., Qu, X., & Zhao, R. C. (2012). Clinical applications of mesenchymal stem cells. *Journal of hematology & oncology*, 5(1), 1.
- Weiss, M. L., Anderson, C., Medicetty, S., Seshareddy, K. B., Weiss, R. J., VanderWerff, I., . . . McIntosh, K. R. (2008). Immune properties of human umbilical cord Wharton's jelly-derived cells. *Stem cells*, 26(11), 2865-2874.
- Wek, R., Jiang, H.-Y., & Anthony, T. (2006). Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochemical Society Transactions*, 34(1), 7-11.
- Welte, T., Leitenberg, D., Dittel, B. N., Al-Ramadi, B. K., Xie, B., Chin, Y. E., . . . Fu, X.-Y. (1999). STAT5 interaction with the T cell receptor complex and stimulation of T cell proliferation. *Science*, 283(5399), 222-225.
- Whiteside, T. L. (1999). Signaling defects in T lymphocytes of patients with malignancy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 48(7), 346-352.
- Wiechert, W. (2001). ^{13}C metabolic flux analysis. *Metabolic Engineering*, 3(3), 195-206.
- Wijnands, K. A., Castermans, T. M., Hommen, M. P., Meesters, D. M., & Poeze, M. (2015). Arginine and citrulline and the immune response in sepsis. *Nutrients*, 7(3), 1426-1463.

- William, T. T., Pendleton, J. D., Beyer, W. M., Egalka, M. C., & Guinan, E. C. (2003). Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*, 75(3), 389-397.
- Yakar, I., Melamed, R., Shakhar, G., Shakhar, K., Rosenne, E., Abudarham, N., . . . Ben-Eliyahu, S. (2003). Prostaglandin E2 suppresses NK activity in vivo and promotes postoperative tumor metastasis in rats. *Annals of Surgical Oncology*, 10(4), 469-479.
- Yeung, A. W., Terentis, A. C., King, N. J., & Thomas, S. R. (2015). Role of indoleamine 2, 3-dioxygenase in health and disease. *Clinical Science*, 129(7), 601-672.
- Youn, J.-I., Nagaraj, S., Collazo, M., & Gabrilovich, D. I. (2008). Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *The Journal of Immunology*, 181(8), 5791-5802.
- Yugi, K., Nakayama, Y., Kinoshita, A., & Tomita, M. (2005). Hybrid dynamic/static method for large-scale simulation of metabolism. *Theoretical Biology and Medical Modelling*, 2(1), 1.
- Zamorano, F., Wouwer, A. V., & Bastin, G. (2010). A detailed metabolic flux analysis of an underdetermined network of CHO cells. *Journal of biotechnology*, 150(4), 497-508.
- Zeddou, M., Greimers, R., de Valensart, N., Nayjib, B., Tasken, K., Boniver, J., . . . Rahmouni, S. (2005). Prostaglandin E 2 induces the expression of functional inhibitory CD94/NKG2A receptors in human CD8⁺ T lymphocytes by a cAMP-dependent protein kinase A type I pathway. *Biochemical pharmacology*, 70(5), 714-724.
- Zelenay, S., van der Veen, A. G., Böttcher, J. P., Snelgrove, K. J., Rogers, N., Acton, S. E., . . . Quezada, S. A. (2015). Cyclooxygenase-dependent tumor growth through evasion of immunity. *Cell*, 162(6), 1257-1270.
- Zhao, L., Zhang, H., Wang, L., Chen, H., Chen, Y. Q., Chen, W., & Song, Y. (2015). 13 C-metabolic flux analysis of lipid accumulation in the oleaginous fungus *Mucor circinelloides*. *Bioresource technology*, 197, 23-29.
- Zhou, C., Yang, B., Tian, Y., Jiao, H., Zheng, W., Wang, J., & Guan, F. (2011). Immunomodulatory effect of human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells on lymphocytes. *Cellular immunology*, 272(1), 33-38.